

بسم الله الرحمن الرحيم

مجله علوم پزشکی مدرّس

فصلنامه پژوهشی

دانشکده علوم پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس

دوره ۱۱، شماره ۳ و ۴، پاییز و زمستان ۱۳۸۷

فهرست مقالات

- تغییرات بیان اینترگرین‌های $\alpha 4$ ، $\beta 1$ ، αv ، $\beta 3$ و لیگاند آن‌ها استئوپونتین در مراحل مختلف چرخه استروس موش..... ۱
فاطمه پیغمبری، مژده صالح‌نیا، مجتبی رضازاده‌ولوجردی، مهدی فروزنده
- بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا بر پیشبرد چرخه سلولی در یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی..... ۹
امیر ثابت‌سروستانی، پرویز عبدالمالکی، سیدجواد مولی، فائزه قناتی، زینب توسلی، عمران حشمتی
- کلونینگ و توالی‌یابی ژن *Leishmania homologue of receptors for activated C kinase (LACK)*..... ۱۹
لیشمانیا ماژور سویه استاندارد ایرانی..... زهیرمحمد حسن
اوغل‌نیاز جرجانی، فاطمه غفاری‌فر، زهره شریفی، عبدالحسین دلیمی،
- تشخیص حذف‌های ناشناخته ژن‌های آلفا- گلوبین در ناقلین آلفا- تالاسمی با استفاده از روش Real-time PCR..... ۳۱
سمیه جمالی، رضا مهدیان، مینا حیات‌نوسعید، صادق باباشاه، فرشته مریمی، مرتضی کریمی‌پور، بهناز زربخش، فائزه رحیمی‌نژاد،
سیروس زینلی
- بررسی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در دو سال متوالی در شهرستان چابهار..... ۴۱
عبدالحسین دلیمی، فاطمه جالوسیان، سیامک میراب‌سمیعی، فاطمه غفاری‌فر، فرامرز سلیمانلو، رامین نقی‌زاده
- مهار ژن *cAMP response element binding protein* توسط siRNA در رده سلولی K562..... ۴۹
زهرا دیلمی‌خیابانی، مهدی بنان، علی‌محمد اصغریان، جلال قره‌سوران، حسین نجم‌آبادی
- راه‌اندازی آزمایش الیزا برای تعیین عیار آنتی‌بادی ضد ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک و مقایسه نتایج با روش
خشی‌سازی ویروس..... ۵۷
کبرا رضوی‌پاشاییگ، حوریه سلیمان‌جاهی، یاشار محمدزاده‌صدیق، محمدحسن روستایی
- بررسی انگل‌شناسی حلزون لیمنه پالوستریس و شناسایی اکولوژی آن در استان مازندران با استفاده از سیستم
اطلاعات جغرافیایی (GIS)..... ۶۵
عبدالرضا صلاحی‌مقدم، امیرحسین محوی، غلام‌رضا مولوی، اسدالله حسینی‌چگینی، جعفر مسعود
- کلونینگ و توالی‌یابی ژن *GRA7 (Granular Antigen7)* توکسوپلازما گونه‌ای..... ۷۳
فاطمه غفاری‌فر، رحمه نوردین، زهره شریفی، عبدالحسین دلیمی، شهلا رودبارمحمدی، سکینه قاسمی‌نیکو
- عفونت نهفته هپاتیت B در اهداکنندگان خون شهرستان رفسنجان..... ۸۱
محمد کاظمی‌عرب‌آبادی، علی‌اکبر پورفتح‌اله، عبدالله جعفرزاده، غلامحسین حسن‌شاهی، محمدرضا افروز، محمود حدادیان
- تأثیر اجزای لیستریا مونوسیتوزنز بر سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ لنفوسیت‌های کمکی نوع ۱..... ۸۷
معصومه معتمدی، سمانه عرب، معصومه خمیس‌آبادی، زهرا غفلی، جمشید حاجتی
- بیانیه..... ۹۷
- برگه اشتراک..... ۹۹
- چکیده مقالات به زبان انگلیسی..... ۱۱۲

تغییرات بیان اینتگرین‌های $\alpha 4$ ، $\beta 1$ ، αv ، $\beta 3$ و لیگاند آن‌ها استئوپوننتین در مراحل مختلف چرخه استروس موش

فاطمه پیغمبری^۱، مؤده صالح‌نیا^{۲*}، مجتبی رضازاده‌ولوجردی^۳، مهدی فروزنده^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۱۲

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۵

چکیده

هدف: با توجه به اهمیت مولکول‌های اینتگرین در لانه‌گزینی و عدم اطلاعات کافی در الگوی بیان این مولکول‌ها در مراحل مختلف چرخه استروس بررسی این مولکول‌ها در اندومتر موش طی مراحل مختلف چرخه استروس ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: حیوانات مورد مطالعه در این تحقیق موش‌های بالغ نژاد NMRI تعداد ۱۵ سر با سن ۶-۸ هفته بودند. ابتدا مراحل مختلف چرخه استروس پرواستروس، استروس، متاستروس و دی‌استروس از طریق بررسی سلول‌شناسی اسمیر واژینال تعیین شد. موش‌ها به تعداد حداقل سه رأس در هر مرحله با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و نمونه بافتی از $\frac{1}{3}$ میانی هریک از شاخ‌های رحمی در هر مرحله تهیه شد، سپس نمونه‌ها به دستگاه کرایواستات منتقل شده و برش‌هایی به ضخامت ۸-۱۰ میکرون از آن‌ها تهیه شد. این لام‌ها برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی و ارزیابی بروز اینتگرین‌های $\alpha 4$ ، $\beta 1$ ، αv ، $\beta 3$ و لیگاند آن‌ها استئوپوننتین به کار گرفته شدند.

نتایج: مطابق یافته‌ها بیان مولکول‌های اینتگرین در اندومتر موش تنها در مرحله متاستروس مثبت بود و در مکان‌های متفاوتی از اندومتر بیان شد. اینتگرین αv تنها در پوشش غددی و اینتگرین $\beta 3$ فقط در غشای قاعده‌ای هر دو نوع پوشش خود را نشان داد در حالی که بیان $\alpha 4$ برای هر دو نوع پوشش و هر دو غشاء مثبت بود. $\beta 1$ تنها اینتگرینی بود که بیان آن هم در پوشش سطحی و غددی و هم در استروما ملاحظه شد. استئوپوننتین فقط در غشای رأسی هر دو پوشش دیده شد و در نقاط دیگر اندومتر دیده نشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که ظهور اینتگرین‌ها در اندومتر براساس اهمیت و اولویت نقش آن در پدیده لانه‌گزینی باشد، بنابراین مولکول‌های $\alpha 4$ ، $\beta 1$ و استئوپوننتین که در پوشش سطحی بیان می‌شوند، می‌توانند در اتصال و چسبندگی سلول به سلول و اینتگرین‌های αv ، $\beta 3$ و $\beta 1$ که در پوشش غددی و استروما بیان می‌شوند، می‌توانند در گسترش و نفوذ جنین مداخله کنند.

کلیدواژگان: اندومتر، اینتگرین، چرخه استروس، ایمونوهیستوشیمی

۱- مقدمه

لقاح، لانه‌گزینی و تشکیل جفت رویدادهای دینامیکی هستند که در آن‌ها ارتباطات پیچیده سلول‌ها با یکدیگر و سلول با ماتریکس (Matrix) خارج سلولی مطرح می‌شوند [۱]. اتصال ماتریکس خارج سلولی به سلول نیاز به پروتئین‌های اتصال عرض غشاء دارد که به‌عنوان گیرنده عمل می‌کنند. مولکول‌های اینتگرین (Integrin) گیرنده‌های گلیکوپروتئینی عرض غشاء هستند و ساختمان هتروداایمریک (زنجیره α و زنجیره β) با اتصال غیرکووالانسی دارند و در تمام مراحل باروری، لقاح، لانه‌گزینی و تکوین جفت مداخله می‌کنند [۲]. اینتگرین‌ها عملکردهای متفاوتی در انواع سلول‌ها دارند. در سلول‌هایی از جمله پوششی، اندوتلیالی یا عضلانی بقای سلولی بسته به ارسال علامت (Signal) از طریق اینتگرین‌ها است، بنابراین در یک جمله می‌توان گفت اینتگرین‌ها به‌عنوان مبدل‌های علامتی عمل می‌کنند و مسیر پیام‌های درون سلولی متفاوتی را هنگام فعال شدن به‌دنبال اتصال به ماتریکس خارج سلولی، تحریک می‌کنند [۱].

بروز کلاس‌های متفاوت اینتگرین در مراحل مختلف واکنش‌های سلولی به عوامل متعددی بستگی دارد. گونه جانوری، نحوه لانه‌گزینی و ماهیت هورمون‌های جنسی از جمله عوامل تأثیرگذار روی بیان اینتگرین‌ها است [۱]. بیان اینتگرین اندومتری (Endometrial integrin) در گونه‌های مختلف متفاوت بوده و در خود یک گونه نیز در زمان‌های مختلف یک چرخه مشابه نیست. بروز این هتروداایمرهای گلیکوپروتئینی ارتباط نزدیکی با بلوغ بافتی اندومتر دارد [۳]. تحقیقات نشان داد که بروز اینتگرین‌ها در زمان لانه‌گزینی گونه‌های مختلف تابع الگوی متفاوتی است [۴] به‌عنوان مثال در انسان و پرمات‌ها نشان داده شده که بیان سه مولکول اینتگرینی $\alpha 1\beta 1$ و $\alpha 4\beta 1$ ، $\alpha v\beta 3$ طی چرخه تولیدمثلی تحت تأثیر هورمون‌های تخمدانی است و در بیماران نازا در درجه لانه‌گزینی کاهش بیان $\beta 3$ و $\alpha 1$ ملاحظه شد [۴، ۵]؛ اما کیمینس (Kimmins) نشان داد در مدل نشخوارکنندگان

برخلاف سایر موجودات بیان این مولکول‌ها در پنجره لانه‌گزینی تفاوتی با سایر زمان‌ها ندارد [۶].

برای اتصال اینتگرین به ماتریکس خارج سلولی نیاز به لیگاندهای ویژه‌ای از جمله کلاژن IV (Collagen IV)، فیبرونکتین (Fibronectin)، لامینین (Laminin) و استئوپونتن (Osteopontin: OPN) است [۲] و از میان آن‌ها OPN به‌عنوان یکی از مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی است که در بیشتر موجودات دیده شد [۷]. OPN در سلول‌های پوششی، ترشحات لوله گوارش، کلیه، تیروئید، پستان، بیضه‌ها، لکوسیت‌ها، سلول‌های عضله صاف و برخی از سلول‌های توموری نیز دیده می‌شود [۸] در سیستم تناسلی، OPN به‌وسیله سلول‌های مرحله ترشحي اندومتر، تروفوبلاست (Trophoblast) مهاجم و جفت ترشح می‌شود [۷، ۸]. در تحقیقات مشخص شده که OPN تحت تأثیر پروژسترون از پوشش غده‌ای رحم ترشح شده و لیگاند آن $\alpha v\beta 3$ در پوشش سطحی است [۹، ۱۰].

با توجه به اهمیت لانه‌گزینی جنین و نیاز به اطلاعات بیشتر برای پراکندگی و نقش اینتگرین‌ها در آماده کردن رحم به‌خصوص در پنجره لانه‌گزینی ضرورت بررسی بیان اینتگرین‌ها و لیگاند OPN در مراحل مختلف چرخه استروس (Estrous cycle) مدل موشی احساس می‌شد تا بتوان از اطلاعات حاصل از این تحقیق در مطالعات بعدی به‌منظور بررسی مداخلات هورمون‌های تخمدانی در تغییر الگوی بروز این پروتئین‌های اتصال استفاده نمود.

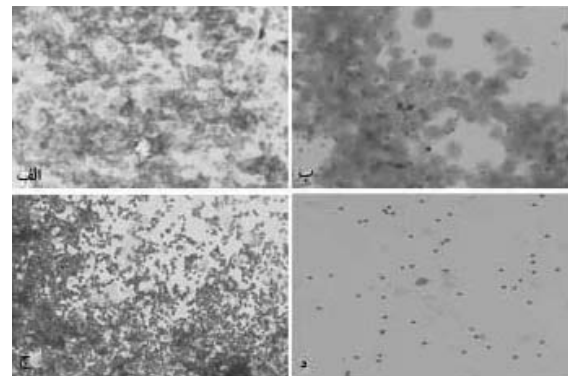
۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌های مورد مطالعه

در این تحقیق از موش‌های سوری ماده بالغ نژاد NMRI با سن ۶-۸ هفته در چهار گروه مربوط به مراحل مختلف چرخه استروس شامل پرو استروس (Proestrous)، استروس، متاستروس (Metestrous) و دی‌استروس (Diestrous) استفاده شد و در هر گروه حداقل سه رأس موش در نظر گرفته شد.

۲-۲- تعیین مراحل چرخه استروس

مراحل چرخه استروس برای هر موش با بررسی اسمیر واژینال تعیین شد. مراحل چرخه استروس با توجه به نسبت سلول‌های موجود در اسمیر پس از رنگ‌آمیزی با متیلن بلو (Methylene blue) تعیین شد. هر حیوان براساس سلول‌شناسی اسمیر واژینال در یکی از چهار مرحله پرواستروس، استروس، متاستروس و دی‌استروس طبقه‌بندی شد (شکل ۱).



شکل ۱ سلول‌شناسی اسمیر واژن در مراحل مختلف از چرخه استروس؛ الف: پرواستروس (بزرگنمایی $\times 400$)، ب: استروس (بزرگنمایی $\times 400$)، ج: متاستروس (بزرگنمایی $\times 400$)، د: دی‌استروس (بزرگنمایی $\times 400$)

۲-۳- تهیه نمونه

پس از تعیین مراحل چرخه استروس در هر مرحله تعداد حداقل سه رأس موش در نظر گرفته شد، سپس موش‌ها به طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و یک نمونه بافتی حدود ۲ میلی‌متر از $\frac{1}{3}$ میانی شاخ رحمی به‌منظور مطالعه ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) تهیه شد.

۲-۴- ایمونوهیستوشیمی

برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی لام‌ها بعد از تثبیت شدن با پارافرمالدهید با PBS (Phosphate Buffered Saline) شسته شده و سپس به‌ترتیب ۳۰ دقیقه در محلول اسید کلریدریک دو نرمال، ۵ دقیقه در محلول بافر بورات و به‌مدت ۰/۵ ساعت تحت تأثیر محلول تریتون X_{100} (۱۰۰۰ لاند بافر فسفات، ۳ لاند تریتون، ۱۰۰ لاند سرم بز) قرار داده شدند. سپس لام‌ها داخل یک

پتری‌دیش مرطوب قرار گرفته و روی هر لام ابتدا چند قطره از آنتی‌بادی‌های اولیه رقیق شده به‌طور جداگانه قرار داده شد (رقت‌های مورد استفاده برای آنتی‌بادی‌های مختلف عبارت بود از αv ۱:۵۰، $\beta 3$ ۱:۴۰، $\alpha 4$ ۱:۱۰۰، $\beta 1$ ۱:۵۰، OPN ۱:۱۰۰، سپس به‌مدت یک شب کلیه ظروف در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و آنتی‌بادی‌های اضافی با PBS شسته شد. ۲-۳ قطره از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با فلوروسین ایزوتیوسیانید (Fluorescein isothiocyanate: FITC) (Anti-Rabbit ۱:۵۰۰)، (Anti-Rat ۱:۵۰) روی هر لام ریخته شد و به‌مدت ۲ ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شدند. بعد از طی ۲ ساعت نمونه‌ها دو بار با PBS شسته و با چسب بافر گلیسرول لامل‌ها روی لام قرار داده شد سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی و کنترل داخلی نیز استفاده شد.

۳- نتایج

۳-۱- تعیین چرخه استروس

ابتدا اسمیر واژن تهیه شد و مراحل مختلف چرخه استروس براساس نسبت سلول‌های موجود در اسمیر تعیین شد (شکل ۱). در مرحله پرواستروس اکثر سلول‌ها، سلول‌های پوشش‌گرد و بزرگ هستند و گاهی اوقات آثاری از شاخی شدن در سلول‌ها دیده می‌شود. گاهی اوقات در این مرحله تعداد کمی لکوسیت نیز مشاهده می‌شود. در مرحله استروس اکثر سلول‌ها از نوع سلول‌های پوشش‌شاخی هستند، سلول‌های مذکور به‌همدیگر وصل شده و ورقه‌های بزرگ سلولی را تشکیل می‌دهند. در مرحله متاستروس سلول‌های شاخی دچار پیکنوز (Pyknosis) شده و تعداد زیادی لکوسیت در اسمیر واژینال دیده می‌شود. در مرحله دی‌استروس تعداد سلول‌های واژینال کم و غالباً لکوسیت هستند.

۳-۲- مشاهدات ایمونوهیستوشیمی

با استفاده از این روش بیان مولکول‌های ایتگرینی $\alpha 4$ ، $\beta 1$ ، $\beta 3$ و αv لیگاند OPN در کلیه مراحل چرخه استروس ارزیابی شد. در سه مرحله پرواستروس، استروس و

دی‌استروس این پاسخ منفی بود و تنها در مرحله مت‌استروس مثبت بود. مکان‌های بروز این پروتئین در پوشش سطحی (غشای رأسی و قاعده‌ای)، پوشش غده‌ای (غشای رأسی و قاعده‌ای) و استروما (Stroma) ارزیابی شد که نتایج ایمونوهیستوشیمی آن در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ بیان اینتگرین‌های αv , $\beta 3$, $\alpha 4$ و $\beta 1$ و OPN در مرحله مت‌استروس موش

استروما	پوشش قاعده‌ای		پوشش سطحی		
	غشای رأسی	غشای قاعده‌ای	غشای رأسی	غشای قاعده‌ای	
	مثبت	مثبت	منفی	منفی	αv
	منفی	مثبت	منفی	مثبت	$\beta 3$
	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	$\alpha 4$
	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	$\beta 1$
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	OPN

مطابق یافته‌های این تحقیق اینتگرین αv تنها در پوشش غددی (غشای رأسی و قاعده‌ای) بیان شد و در پوشش سطحی و استروما بیانی نداشت. اینتگرین $\beta 3$ فقط در غشای قاعده‌ای هر دو نوع پوشش خود را نشان داد و در استروما بیان نشد. بیان $\alpha 4$ برای هر دو نوع پوشش و هر دو غشاء مثبت بود اما در استروما دیده نشد. $\beta 1$ تنها اینتگرینی بود که بیان آن هم در پوشش سطحی و غددی (هر دو نوع غشاء) و هم در استروما ملاحظه شد. بیان OPN فقط در غشای رأسی هر دو پوشش بود و در استروما بیانی نداشت (شکل ۲).

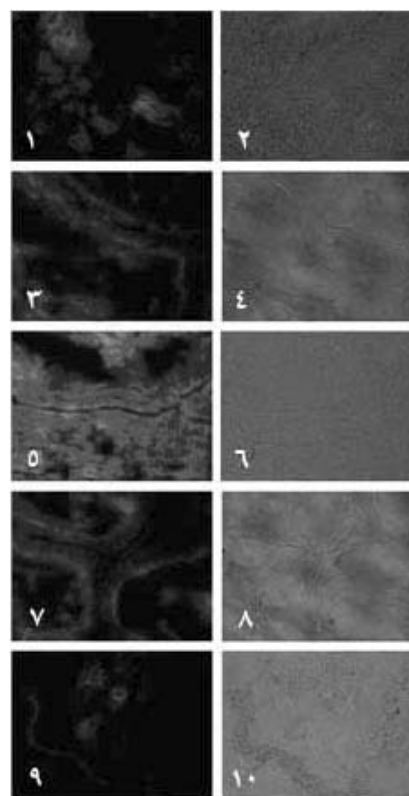
۴- بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که اینتگرین‌ها تنها در مرحله مت‌استروس چرخه استروس بیان شده و در دیگر مراحل دیده نشده است. به نظر می‌آید که با توجه به این‌که فولیکول‌های گراف (Graafian follicle) در اوایل مرحله استروس به بلوغ می‌رسند و تشکیل جسم زرد در مرحله مت‌استروس است این مرحله را می‌توان معادل مرحله ترشچی در سایر موجودات دانست بنابراین بالا بودن میزان هورمون پروژسترون در این مرحله می‌تواند یکی از دلایل القای بیان اینتگرین‌ها در این مرحله باشد.

در تأیید این موضوع فضل‌عباس (Fazleabas) و همکارانش نشان دادند که بیان اینتگرین در رحم میمون تحت کنترل هورمون پروژسترون است [۵].

کروس (Creus) و همکارانش عنوان کردند که بیان اینتگرین $\alpha v \beta 3$ در اندومتر انسان به بلوغ اندومتر بستگی دارد و هورمون‌های جنسی قادرند بر این بیان اثر بگذارند [۱۱].

ون‌ولف (von Wolff) و همکارانش به این نتیجه رسیدند که در اواسط و اواخر دوره ترشح، میزان mRNA مربوط به بیان $\beta 3$ حدود ۵-۱۰ برابر می‌شود در حالی‌که افزایش بیان این زیرواحد اینتگرینی در مرحله تکثیر به این اندازه نبود. این خود می‌تواند بیانگر وابستگی بیان زیرگروه‌های اینتگرینی به هورمون‌های جنسی و اثر این



شکل ۲ ایمونوهیستوشیمی اینتگرین‌های αv (۱، ۲)، $\beta 3$ (۳، ۴)، $\alpha 4$ (۵، ۶)، $\beta 1$ (۷، ۸) و لیگاند آن‌ها OPN (۹، ۱۰)، در مقاطع عرضی بافت اندومتر موش و در مرحله مت‌استروس از چرخه استروس (بزرگمایی $\times 400$)، لازم به ذکر است که ستون اول مشاهدات با میکروسکوپ فلوروسنت و ستون دوم تصاویر مرحله کنتراست همان برش‌ها در ستون مقابل است.

هورمون‌ها بر اندومتر رحم باشد [۱۲].

توموس (Thomus) و همکارانش دریافتند که بیان اینتگرین‌ها در اندومتر طی چرخه جنسی در حال تغییر است و در افراد نابارور الگوهای غیرعادی از بروز اینتگرین در رحم دیده می‌شود [۴].

همچنین بخش دیگری از نتایج این تحقیق نشان داد که از نظر مکان بروز، اینتگرین‌های مختلف در مرحله متاستروس تفاوت دارند. اینتگرین αv تنها در پوشش غددی، اینتگرین $\beta 3$ فقط در غشای قاعده‌ای هر دو نوع پوشش و بیان $\alpha 4$ برای هر دو نوع پوشش و هر دو غشاء دیده شد. $\beta 1$ تنها اینتگرینی بود که بیان آن هم در پوشش سطحی و غددی و هم در استروما دیده شد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که مکان‌های متفاوتی از بیان اینتگرین‌ها در اندومتر قابل ملاحظه است که اختلاف در این مکان‌ها نشانه اهمیت و اولویت مولکول در پدیده لانه‌گزینی است.

به نظر می‌رسد مولکول‌هایی که در پوشش سطحی این مرحله بیان شدند از جمله $\alpha 4$ ، $\beta 1$ و OPN، اغلب در اتصال و چسبندگی جنین به اندومتر و اینتگرین‌هایی که در پوشش غددی و استروما بیان شدند (αv ، $\beta 3$ و $\beta 1$) در گسترش و نفوذ جنین به این بافت مداخله می‌کنند.

بنابراین لازمه انجام پدیده لانه‌گزینی تغییرات فنوتیپی اینتگرین‌ها در سطح اندومتر و سلول‌های جنینی است. بدین ترتیب که در زمان نزدیک به لانه‌گزینی اغلب اینتگرین‌های مداخله کننده در اتصال سلول به سلول (برای چسبندگی بیشتر) و در مرحله نفوذپذیری جنین اینتگرین‌های مداخله کننده در اتصالات سلول به ماتریکس خارج سلولی (برای نفوذپذیری بیشتر) مطرح می‌شود.

با توجه به بیان زیرواحدهای اینتگرینی متفاوت در سطح بلاستوسیست‌ها (Blastocysts) و تروفوبلاست‌های جنینی یا به عبارت دیگر تغییرات فنوتیپی اینتگرین‌ها، حضور لیگاندی در سطح مادری که قادر به شناخت طیف وسیعی از این گیرنده‌ها باشد کاملاً ضروری است.

بلور (Bloor) و همکارانش بیان $\alpha 2$ ، $\alpha 3$ ، αv را در

رویانه‌های بعد از بلاستوسیست انسانی نشان داده و $\alpha v \beta 3$ را به عنوان یک گیرنده در سطح تروفوبلاست‌های ابتدایی معرفی کردند [۱۳].

باساک (Basak) و کین (Qin) نیز مشخص کردند که زیرواحدهای αv ، $\alpha 6$ ، $\alpha 5$ ، $\alpha 4$ ، $\alpha 2$ ، $\beta 1$ و $\alpha 1$ در سلول‌های تروفوبلاست جنینی قبل از جایگزینی بروز می‌کنند [۱۴، ۱۵].

از آنجایی که در بین لیگاندهای اینتگرینی، OPN قادر به برقراری ارتباط با اکثر اینتگرین‌ها است، نسبت به سایر پروتئین‌ها از اهمیت بیشتری در لانه‌گزینی برخوردار است و نتایج نشان داد که OPN تنها در مرحله متاستروس چرخه استروس و آن هم فقط در غشای رأسی هر دو پوشش سطحی و غده‌ای بیان شد. با توجه به تعریفی که قبلاً از این مرحله شد، می‌توان گفت که بیان این لیگاند می‌تواند تحت تأثیر هورمون‌های جنسی به خصوص پروژسترون باشد؛ از طرفی با توجه به این که جنین در دریچه لانه‌گزینی طیف وسیعی از اینتگرین‌ها را در سطح خود بیان می‌کند که فنوتیپ آن‌ها دائماً در حال تغییر است. حضور OPN آن هم در غشای رأسی هر دو پوشش سطحی و غده‌ای بیانگر واکنش اینتگرین‌های متعدد توسط این لیگاند و نقش این ماتریکس خارج سلولی در مراحل اولیه لانه‌گزینی جنین است.

ونولف و همکارانش به مطالعه OPN رحمی به عنوان یک لیگاند برای اینتگرین‌ها در انسان پرداخته و نشان دادند تجمع پروتئین OPN موجود در رحم در مرحله تکثیر کم و در مرحله ترشح به سه تا چهار برابر اندازه آن در مرحله تکثیر می‌رسد. این خود می‌تواند بیانگر وابستگی بیان این پروتئین به هورمون‌های جنسی و اثر این هورمون‌ها بر لیگاند اینتگرین‌ها در رحم باشد [۱۲].

هیرک (Hierck) و همکارانش بیان داشتند که تغییرات فنوتیپی اینتگرین‌ها در سطح سایتوتروفوبلاست (Cytotrophoblast) به عنوان مثال تغییر از بیان اینتگرین $\alpha 6$ به $\alpha 1$ منجر به ارتباط بیشتر آن‌ها با لامینین شده و این امر بر حرکت سلول‌ها در پاسخ به لیگاند مربوط و در نتیجه

نفوذپذیری بیشتر مؤثر است [۱۶].

۵- تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر در گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است؛ بنابراین نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از زحمات کارشناسان آزمایشگاه این گروه جناب آقای پوربیراوند و سرکار خانم ابراهیمی که در تهیه نمونه‌ها و عکس‌برداری ما را یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی شود.

بنابراین براساس یافته‌های این تحقیق به‌نظر می‌رسد که بیان اینتگرین‌ها و لیگاند آن‌ها OPN فقط در مرحله متاستروس از چرخه استروس مدل موشی است. این بیان در سطح رحمی می‌تواند تحت تأثیر هورمون پروژسترون و علائم جنینی در پنجره لانه‌گزینی باشد و به‌نظر می‌رسد تفاوت در مکان بیان اینتگرین‌ها و لیگاند آن‌ها نشان‌دهنده اهمیت‌شان در پدیده لانه‌گزینی است.

۶- منابع

- [1] Jeffery AB, Joan SH. The role of integrins in reproduction. *Biol Med* 2000; 223(4): 331-43.
- [2] Tabibzadeh S. Patterns of expression integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1992; 7(6): 876-82.
- [3] Lessey BA, Ilesanmi AO, Lessey MA, Riben M, Harris JE, Chwalisz K. Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle. *J Reprod* 1996; 35(3): 195-204.
- [4] Thomas K, Thomson AJ, Sephton V, Cowan C, Wood S, Vince G, Kingsland CR, Lewis-Jones DI. The effect of gonadotrophic stimulation on integrin expression in the endometrium. *Hum Reprod* 2002; 17(1): 63-8.
- [5] Fazleabas AT, Bell SC, Flemming A, Sun J, Lessey BA. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 1997; 56(2): 348-56.
- [6] Kimmins S, Lim HC, Maclaren LA. Immunohistochemical localization of integrin alpha v beta 3 and osteopontin suggests that they do not interact during embryo implantation in ruminants. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 19-33.
- [7] Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Expression and distribution of osteopontin in human tissue: wide spread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 1992; 3(10): 1169-80.
- [8] Kreiss T, Vale R. Gvidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. Oxford, England, Oxford Univ Press, 1993; p: 76-9.
- [9] Johnson GA, Burghardt RC, Spencer TE, Newton GR, Ott TL, Bazer FW. Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biol Reprod* 1999; 61(4): 892-9.
- [10] Johnson GA, Spencer TE, Burghardt RC, Bazer FW. Ovine osteopontin: I. Cloning and expression of messenger ribonucleic acid in the uterus during the periimplantation period. *Biol Reprod* 1999; 61(4): 884-91.
- [11] Creus M, Balasch J, Ordi J, Fábregues F,

- Casamitjana R, Quinto L, Coutifaris C, Vanrell JA. Integrin expression in normal and out-of-phase endometria. *Hum Reprod* 1998; 13(12): 3460-8.
- [12] von Wolff M, Strowitzki T, Becker V, Zepf C, Tabibzadeh S, Thaler CJ. Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertil Steril* 2001; 76(4): 775-81.
- [13] Bloor DJ, Metcalfe AD, Rutherford A, Brison DR, Kimber SJ. Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(3): 237-45.
- [14] Basak S, Dhar R, Das C. Steroids modulate the expression of $\alpha 4$ integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biol Reprod* 2002; 66(6): 1784-9.
- [15] Qin L, Wang YL, Bai SX, Xiao ZJ, Herva R, Piao YS. Expression of integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface during tubal implantation. *Reprod* 2003; 126(3): 383-91.
- [16] Hierck BP, Thorsteinsdóttir S, Niessen CM, Freund E, Iperen LV, Feyen A, Hogervorst F, Poelmann RE, Mummery CL, Sonnenberg A. Variants of the alpha 6 beta 1 laminin receptor in early murine development: distribution, molecular cloning and chromosomal localization of the mouse integrin alpha 6 subunit. *Cell Adhesion Commun* 1993; 1(1): 33-53.

بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا بر پیشبرد چرخه سلولی در یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

امیر ثابت سروستانی^۱، پرویز عبدالمالکی^{۲*}، سیدجواد مولی^۳، فائزه قناتی^۴، زینب توسلی^۱، عمران حشمتی^۱

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۲۲

چکیده

هدف: میدان‌های مغناطیسی از پدیده‌هایی است که امروزه همه جا در محیط پیرامون ما یافت می‌شود. سیم‌های فشار قوی، دستگاه‌های الکتریکی که در خانه‌ها و محیط کار فراوان یافت می‌شوند، وسایل ترابری مانند قطارهای شهری و همچنین دستگاه‌های گوناگون تشخیصی و درمانی همچون MRI زاینده میدان‌های مغناطیسی پیرامون ما هستند. میدان‌های مغناطیسی می‌توانند اثرهای گوناگونی بر جانداران از سطح سلول تا پیکره گیاهان، جانوران و آدمی بگذارند. در بررسی‌های اپیدمیولوژیک اثر این میدان‌ها در بالا رفتن میزان بروز برخی از سرطان‌ها همچون سرطان خون به‌خوبی نشان داده شده است. در آزمایش‌های گوناگون دانشمندان کوشیده‌اند تا به ساز و کار این اثرهای زیستی پی ببرند؛ اما داده‌های به‌دست آمده بسیار ناهم‌آهنگ و گستره انجام این بررسی‌ها چه از دیدگاه فیزیکی (بزرگی میدان، بسامد، زمان میدان‌دهی و ...) و چه از دیدگاه زیستی (گونه یاخته، میزان تمایز و ...) پراکنده است. گرچه این پژوهش‌ها در یاخته‌های کشت شده در بیرون از بدن جاندار به انجام رسیده است، می‌تواند شاهدی بر فرایندهای طبیعی یاخته در بدن نیز باشد. در این تحقیق هدف دستیابی به نتایجی است که بر پایه آن‌ها بتوان به درک بهتری از ساز و کار تأثیر میدان بر جانداران در سطح سلولی دست یافت.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، اثرهای زیستی میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلا روی یاخته‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان موش صحرایی سنجیده شد. برای این کار روش فلوسایتومتری با فلوروکروم پروپیدیوم دید به‌کار گرفته شد که با تشخیص محتوای DNA یاخته‌ها معیاری برای پی بردن به مرحله‌ای که سلول در آن به سر می‌برد را به‌دست می‌دهد. میدان مغناطیسی به‌کار گرفته شده حاصل از عبور جریان ۱۲ آمپری از سیم‌پیچ‌ها با بزرگی ۱۵ میلی‌تسلا اعمال شد.

نتایج: با آنالیز چرخه یاخته‌ای دگرگونی‌هایی در مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای دیده شد؛ به‌گونه‌ای که شمار یاخته‌هایی که در مرحله G0/G1 بودند افزایش معنی‌داری نشان داد. این افزایش شمار یاخته‌ای به دلیل افزایش در طول مرحله G0/G1 چرخه بوده است. همچنین این اثر در یاخته‌هایی که پیش از تیمار مغناطیسی در معرض پراکسید هیدروژن که از دسته مواد شیمیایی اکسنده است، قرار گرفته بودند اثر مشابهی را نشان داد. در مرحله S از چرخه نیز در شمار یاخته‌های دو گروه از تیمار کاهش مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این پدیده می‌تواند در اثر آسیب ماده ژنتیکی یاخته یا اختلال در کارکرد پروتئین‌های چرخه یاخته‌ای باشد که هر دو فرایند می‌تواند آغازی بر ناهنجاری در فرایندهای طبیعی یاخته باشد. از آن‌جا که انرژی این

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه بیوفیزیک، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵

میدان‌ها در حدی نیست که بتواند به‌طور مستقیم بر مولکول‌ها اثر گذار باشد، فرایندهای غیرمستقیم با واسطه‌های رادیکالی محتمل‌ترین مکانیسم به‌شمار می‌آید.

کلیدواژگان: یاخته‌های بنیادی مزانشیمی، میدان مغناطیسی ایستا، چرخه یاخته‌ای

۱- مقدمه

نخستین نشانه از واکنش مستقیم میان میدان‌های مغناطیسی و جهان زنده در سال ۱۹۸۰، با شناسایی باکتری‌های مگنتوتاکتیک (Magnetotactic bacteria) به‌دست آمد. این تک یاخته‌های بی‌هوازی دارای زنجیره‌ای از بلورهای مگنتیت (Magnetite crystal) (Fe_3O_4) هستند [۱-۳]. مگنتیت در یاخته‌های گوناگون از خزّه گرفته تا زنبورها و پرنده‌ها دیده می‌شود. پاسخ به میدان‌های الکترومغناطیسی در مغز انسان و دیگر ریزاندام‌ها نیز دیده شده است [۴].

در فرایندهای سوخت و ساز یاخته‌ها، همواره رادیکال‌های آزاد به‌میان می‌آیند که گرچه دارای نیمه عمر کوتاهی هستند، نقش بزرگی در این فرایندها بازی می‌کنند. این رادیکال‌ها با حمله به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به آن‌ها آسیب می‌رسانند. بر پایه بررسی‌های گذشته میدان‌های مغناطیسی بیش از یک میلی‌تسلا بر واکنش‌های شیمیایی که میانجی‌های رادیکالی دارند اثرگذار هستند. میدان‌های مغناطیسی با شکافت زیمان (Zeeman effect)، دگرگونی‌هایی در ترازهای انرژی الکترون‌ها پدید می‌آورند؛ پس با پیدایش حالت سه‌گانه (Triplet) (جفت رادیکالی که در میدان مغناطیسی بیرونی ترازهای انرژی به سه زیرتراز انرژی تفکیک می‌شود) در میدان مغناطیسی بیرونی بیشتر رادیکال‌ها از هم دور می‌شوند و بیش از پیش با مولکول‌های زیستی واکنش می‌دهند. از آن‌جا که برای پیدایش پیوند به یک جفت رادیکال یگانه (Singlet) (جفت رادیکالی که در میدان مغناطیسی بیرونی ترازهای انرژی تفکیک نمی‌شود) نیاز است، بزرگ‌ترین اثر میدان مغناطیسی، برداشتن هم‌ترازی انرژی میان جفت رادیکال‌های سه‌گانه است [۳]. گفتنی است از آن‌جا که انرژی میدان‌های مغناطیسی آزموده شده در این بررسی نمی‌تواند پیوندهای شیمیایی را بشکند، بنابراین هیچ همانندی میان آسیب‌های

زیستی پرتوهای یون‌ساز و این گونه میدان‌ها نیست [۳]. پیامدهای زیستی میدان‌های مغناطیسی از دیدگاه‌های گوناگونی بررسی شده است؛ با این حال تاکنون هیچ سند متقاعد کننده علمی در دست نیست که روشن کند که میدان‌های مغناطیسی به ما زیان می‌رسانند یا نه. هدف از انجام این تحقیق مطالعه اثر میدان مغناطیسی ایستا (Static magnetic field) بر تغییر طول مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای است، چرا که هر گونه اثر استرسی وارد بر سلول یا تغییر در سینتیک واکنش‌های ساخت و ترمیم یاخته‌ای می‌تواند در چرخه یاخته‌ای نمود پیدا کند.

بوئمی (Buemi) و همکارانش (۲۰۰۱) اثرهای میدان مغناطیسی ایستای ۰/۵ میلی‌تسلا را بر رشد و مرگ و میر یاخته‌های کلیوی (VERO) و بافت ستاره‌ای قشری موش صحرایی بررسی کرده و نشان دادند که اثرهای میدان مغناطیسی در رده‌های گوناگون یاخته‌ای یکسان نیست [۵].

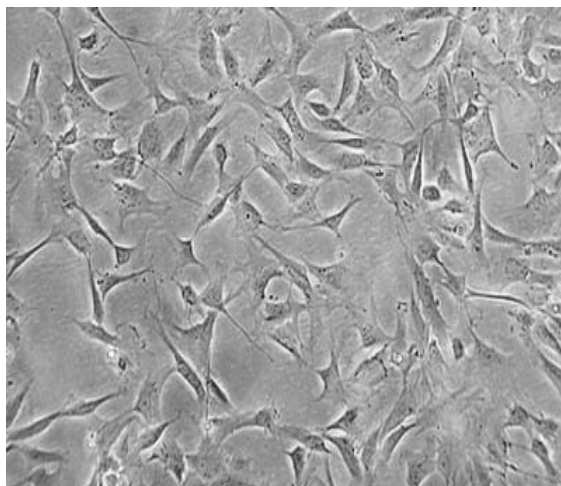
ژانگ (Zhang) و همکارانش (۲۰۰۳) اثرهای جهش‌زایی میدان‌های مغناطیسی ایستای قوی را بر یاخته‌های اشرشیاکلی سنجیدند. جهش‌یافته‌های گوناگون اشرشیاکلی به مدت ۲۴ ساعت در میدان‌های ۹ تسلا قرار گرفتند. میزان جهش در جهش‌یافته‌های sodAsodB و soxR که در مکانیسم‌های دفاعی در برابر فشار اکسیداتیو کاستی داشتند به‌طور قابل توجهی افزایش یافت [۶].

ناکاهارا (Nakahara) و همکارانش (۲۰۰۲) در یاخته‌های تخمدان همستر چینی CHO-K1 که برای بیش از ۴ روز در میدان ۱۰ تسلا قرار داشتند تغییری در میزان رشد یاخته و توزیع چرخه یاخته‌ای نیافتند؛ ولی میدان ۱۰ تسلا افزایش معنی‌داری را در تعداد ریزهسته‌های یاخته‌های پرتو گرفته نشان داد [۷].

زمیسلون (Zmyslony) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با به‌کارگیری روش سنجش کامت، دریافتند هنگامی که یاخته‌های

رازی (karaj، ایران) خریداری و در شرایط مناسب نگهداری شدند. برای جداسازی یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، ابتدا موش‌ها را با کلروفرم (Merck، آلمان) بی‌هوش کرده، اندام‌های پایینی را تشریح و استخوان‌های ران و ساق را بیرون آورده در پتری‌دیش دارای PBS (Phosphate Buffered Saline) سرد گذاشته شد. دو سر استخوان‌ها با کمک قیچی استخوان‌بر برش و سر سرنگ در یکی از دو سوی استخوان فروبرده شده همراه با فشار، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت α -MEM (Invitrogen، آمریکا) به داخل مغز استخوان، در فلاسک کشت یاخته (Orange، بلژیک) تخلیه شد. سپس محیط کشت با غلظت ۲۰٪ سرم جنین گاوی (Invitrogen، آمریکا) به فلاسک کشت افزوده شده، فلاسک به انکوباتور کشت یاخته با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای نمناک دارای ۵ درصد CO_2 برده شد.

یاخته‌های جدا شده، در همین شرایط کشت نگهداری شده و هر روز برای بررسی رشد و بررسی آلودگی احتمالی در زیر میکروسکوپ وارون (Invert microscope) دیده شدند (شکل ۱).



شکل ۱ یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

محیط کشت یاخته‌ها نیز در هر دو تا سه روز با محیط تازه دارای ۲۰ درصد سرم جنین گاوی جایگزین شد. یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در واکشت‌های (Subculture) نخستین، رشد بسیار خوبی دارند و در محیط کشت دارای ۲۰ درصد سرم، هر چهار تا پنج روز یک‌بار نیاز به واکشت دارند.

در محیط کشت دارای FeCl_2 همزمان در میدان مغناطیسی ۷ میلی‌تسلا قرار گرفتند، تعداد یاخته‌های آسیب‌دیده بیش از ۲۰ درصد افزایش یافت [۸].

هیروس (Hirose) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ افزایش معنی‌داری را در بیان ژن پروتئین c-Jun در یاخته‌های HL-60 که برای ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت در میدان ۶ تسلا با گرادیان $41/7$ تسلا بر متر بودند، یافتند. این یافته‌ها به ما پیشنهاد می‌کند که اثر این میدان‌های قوی بر یاخته از مسیرهایی است که بیان پروتئین c-Jun در آن بالا است [۹].

تودوری (Teodori) و همکارانش در سال ۲۰۰۲، یاخته‌های HL-60 را برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ۶ میلی‌تسلا قرار دادند. این میدان مغناطیسی ایستا هیچ‌گونه اثری بر مرگ برنامه‌ریزی شده یاخته (Apoptosis) و نکروزیس (Necrosis) نداشت اما در کنار کمپوتوسین (Camptothecin)، تندی رفتن یاخته از نکروز پسین به مرگ برنامه‌ریزی شده، افزایش داشت [۱۰].

جاجته (Jajte) و همکارانش افزایشی را در شمار آسیب‌های DNA یاخته‌های لنفوسیت خونی که همزمان در کلرید آهن II و میدان مغناطیسی ایستای ۷ میلی‌تسلا بودند، یافتند که این آسیب شاید به مرگ برنامه‌ریزی شده یا نکروزیس این یاخته‌ها بینجامد. در حالی که هیچ‌کدام از این دو تیمار به تنهایی بر یاخته‌های خونی اثرگذار نبوده است [۱۱]. فلیپو (Flipo) [۱۲] و فانلی (Fanelli) نیز آثار مشابهی بر تغییر میزان مرگ برنامه‌ریزی شده یاخته، یافتند [۱۳].

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا در چرخه سلولی است و برای این منظور سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به‌عنوان هدف بیولوژیک در نظر گرفته شده است. مطالعه چگونگی تغییرات ایجاد شده کمک مؤثری به ما در شناخت خصوصیات فیزیکی سلول‌های بنیادی می‌نماید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت یاخته‌های بنیادی

موش‌های صحرایی جوان (۱-۳ ماه) از مؤسسه تحقیقاتی

۲-۲- دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا

دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا، طراحی و ساخته شده در گروه بیوفیزیک دانشگاه تربیت مدرس، با توان یک کیلووات و بیشینه جریان‌گذاری ۵۰ آمپر، می‌تواند میدان مغناطیسی تا ۵۰ میلی‌تسلا (با شدت بهینه ۲۵ میلی‌تسلا) را پدید آورد. یک ترانس که چشمه جریان الکتریسته است نیز در کنار این دستگاه به کار گرفته شده است. با تنظیم جریان از سیم پیچ‌های دستگاه، میدان مغناطیسی پدید می‌آید؛ سپس این میدان از راه بازوهای به گوشی‌های آهنین می‌رسد و ما میدان یکنواختی را در میان آن دو خواهیم داشت. این گوشی‌های گرد آهنین با لایه نازکی از نیکل پوشیده شده‌اند و نمونه‌های آزمایشی در میان این دو جای خواهند گرفت (شکل ۲).



شکل ۲ دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا

برای بهبود میدان برگه‌های فرومغناطیسی آهنی که با لایه‌های دیامغناطیسی جدا شده‌اند، به کار رفته است. این لایه‌های دیامغناطیسی برای جلوگیری از پدید آمدن جریان‌های گردابی است که از کارایی دستگاه می‌کاهد. بهتر است پیش از تیمار نمونه‌ها، دستگاه با تسلا متر کالیبره شود.

از آنجا که جریان بالای الکتریسته با گرمایی دما را در دستگاه بالا می‌برد، لوله‌هایی مسی پیرامون سیم پیچ‌ها پیچانده شده است تا با گذشتن آب از درون آن‌ها از افزایش دما جلوگیری شود.

۲-۳- تیمار یاخته‌های کشت شده با میدان مغناطیسی

یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، پس از چندبار واکشت و به دست آمدن فلاسک‌های پر از یاخته

برای تیمار با میدان مغناطیسی آماده‌اند. محیط کشت تازه ۴۸ ساعت پس از هر واکشت جایگزین محیط پیشین و دوباره ۴۸ ساعت پس از جایگزینی محیط تازه، واکشت دوباره انجام شد. برای تیمار یاخته‌ها فلاسک‌هایی به کار رفت که ۲۴ ساعت از آخرین جایگزینی محیط کشت آن‌ها گذشته بود تا همه در یک مرحله رشد باشند. فلاسک‌ها در هنگام تیمار نزدیک به یک میلیون یاخته داشتند و این اندازه یاخته برای آزمون‌های گوناگون چرخه یاخته‌ای بسیار مناسب است.

فلاسک‌ها برای تیمار با میدان به دو دسته تقسیم شدند. یک دسته فلاسک‌هایی که تنها دارای یاخته بود و دسته دیگر فلاسک‌هایی که در هنگام تیمار با میدان دارای ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن بودند. همان‌گونه که در بخش آنالیز آماری گفته شد، هر یک از تیمارها دارای سه تکرار بود. از آنجا که یاخته‌های بنیادی بایستی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد CO₂ نگهداری شوند، محدودیت زمانی در زمان میدان‌دهی وجود داشت. از این رو تیمار یاخته‌ها با میدان مغناطیسی ایستایی با بزرگی ۱۵ میلی‌تسلا برای مدت ۵ ساعت پیوسته انجام شد چرا که میزان تغییرات CO₂ در این بازه زمانی و بازه‌های زمانی کوتاه‌تر، قابل چشم‌پوشی است.

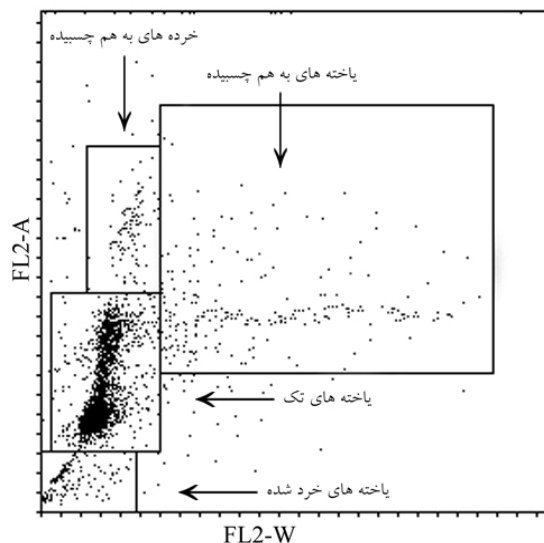
۲-۴- آنالیز یاخته‌های رنگ‌آمیزی شده به کمک

دستگاه فلوسایتومتر (Flocytometry)

فلوسایتومتری با به‌کارگیری ترکیبی از سیستم‌های مایع، پرتوی و الکترونیکی که در زیر آورده می‌شود، ویژگی‌های گوناگونی از مولکول‌های زیستی و گاه یاخته را اندازه‌گیری کرده و پس از گردآوری داده‌ها به آنالیز آن‌ها می‌پردازد. داده‌های به‌دست آمده در این روش نشان‌دهنده اندازه نسبی یاخته‌ها، گرانولیتی نسبی یا میزان پیچیدگی درونی یاخته‌ها و میزان نسبی فلورسانس است [۱۴].

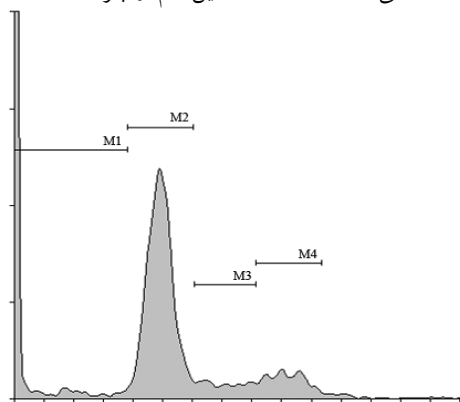
یاخته‌های خونی از بهترین نمونه‌ها برای به‌کارگیری در فلوسایتومتری است؛ چرا که آن‌ها خود یاخته‌هایی تک تک بوده و به آسانی سوسپانسیون می‌دهند؛ اما یاخته‌های استرومای مغز استخوان از دید کشت یاخته‌ای، در رده یاخته‌های چسبان

چسبیده، خرد شده و همچنین یاخته‌های خرد شده‌ای که اکنون به هم چسبیده‌اند و ما را در گردآوری داده‌های پایانی گمراه می‌کنند. این یاخته‌های نامطلوب را نمی‌توان از یاخته‌های تک‌تک درون کووت سوا کرد؛ اما پس از گرفتن داده‌ها، می‌توان پیش از بررسی هیستوگرام‌ها، آن‌ها را از داده‌های خام به کمک نموداری در بخش Dot plot نرم‌افزار که پهنای فلورسانس FL2 را نسبت به سطح علامت نمایش دهد، دور ریخت (شکل ۳) [۱۶].



شکل ۳ جدا کردن یاخته‌های تک از دیگر یاخته‌ها و اجزا یاخته‌ای

برای نمایش شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای باید هیستوگرام علامت FL2-A نسبت به شمار یاخته‌ها را کشید (شکل ۴). در این نمودار دو قله دارد. از آن‌جا که بیشتر یاخته‌ها در مراحل G0 و G1 هستند پس قله نخست که بیشینه‌ای را در شمار یاخته‌ها نشان می‌دهد، نشان‌دهنده همین گام از چرخه است.



شکل ۴ تعیین مراحل گوناگون یاخته‌ای با کمک هیستوگرام محتوای DNA

قرار می‌گیرند. برای به‌کارگیری روش فلوسایتومتری در این گونه یاخته‌ها، نخست باید آن‌ها را از کف فلاسک دارای محیط کشت جدا کرد و آن‌گاه با پیتاژ شدید با کمترین آسیب به یاخته‌ها آن‌ها را به‌صورت تک در آورد. با این همه باز هم یاخته‌های به هم چسبیده و همچنین یاخته‌هایی که در طول مراحل گوناگون تیمار خرد شده‌اند، در نمونه موجود است که باید پیش از تفسیر هیستوگرام‌های محتوای DNA یاخته‌ای، از دیگر یاخته‌ها جدا شده و کنار گذاشته شوند [۱۵]. یاخته‌های رنگ‌آمیزی شده برای آنالیز به درون کووت‌های ویژه‌ای ریخته شده، درون دستگاه جای می‌گیرند. دستگاه فلوسایتومتر بر پایه اندازه نور فلورسانسی که از هر یاخته بازتاب می‌شود، با سنجش DNA یاخته که نمایان‌کننده هر کدام از مراحل چرخه سلولی است، یاخته‌هایی را که در هریک از گام‌های گوناگون چرخه هستند، شمارش می‌کند. داده‌های به‌دست آمده از دستگاه فلوسایتومتر خام بوده و برای بازیابی داده‌ها، نرم‌افزارهای ویژه‌ای همچون نرم‌افزار WIN-MDI به‌کار می‌رود که می‌تواند داده‌هایی همچون شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون را از دل داده‌های خام نخستین دستگاه بیرون آورد.

با دانستن طول چرخه یاخته‌ای یا همان بازه زمانی میان دو میتوز و نسبت یاخته‌هایی که در مرحله‌ای از این چرخه هستند به همه یاخته‌ها، می‌توان طول هریک از این مراحل را به‌دست آورد. برای نمونه، معادله روبه‌رو طول مرحله S را به‌دست می‌دهد:

$$T_S = \frac{T_C \times \ln(f_S + 1)}{\ln 2}$$

که در آن T_C طول چرخه یاخته‌ای و f_C نسبت شمار یاخته‌هایی

که در مرحله S از این چرخه هستند به همه یاخته‌ها است [۱۵].

در این تحقیق، با به‌کارگیری فلوروکروم پروپیدیوم یدید (fluorocromes Propidium Iodide: PI) و دستگاه فلوسایتومتر بکتون-دیکینسون (Becton-Dickinson) (Franklin، آمریکا) محتوای DNA سلولی سنجیده شد و از روی این محتوا شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون به‌دست آمد که معیاری برای پی بردن به طول چرخه یاخته‌ای و تغییرات آن است.

در نمونه‌ای که برای آنالیز درون کووت دستگاه ریخته می‌شود، انواع یاخته‌ها یافت می‌شود؛ یاخته‌های تک‌تک، به هم

میکرومولار پراکسید هیدروژن در محیط کشت بود. پس در هر آزمون چهار فلاسک به این شرح بود: یک فلاسک C دارای محیط کشت که فلاسک کنترل نامیده می شود؛ یک فلاسک CB دارای محیط کشت که در میدان مغناطیسی ۱۵ میلی تسلایی جای گرفت؛ یک فلاسک H دارای ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن بیرون از میدان و یک فلاسک HB دارای ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن در میدان مغناطیسی ایستا تیمار شد (جدول ۱).

جدول ۱ دسته بندی یاخته های بنیادی برای تیمار با پراکسید هیدروژن و میدان مغناطیسی

زمان	میدان مغناطیسی	پراکسید هیدروژن	گروه های آزمایشی
۵ ساعت	-	-	C
۵ ساعت	۱۵ میلی تسلا	-	CB
۵ ساعت	-	۱۰۰ میکرومولار	H
۵ ساعت	۱۵ میلی تسلا	۱۰۰ میکرومولار	HB

فلاسک های یاخته ای که هر کدام بیش از یک میلیون یاخته داشتند، برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی تسلایی جای گرفتند. این یاخته ها پس از میدان گیری، بی درنگ از فلاسک ها جدا و پس از سانتریفوژ در یک بخش محلول بافر فسفات و چهار بخش الکل ۷۰ درجه تثبیت و پس از ۲۴ ساعت رنگ آمیزی و در دستگاه فلوسایتومتر بکتون- دیکینسون ارزیابی شدند. از هر کووت درست ۱۰۰۰۰ یاخته شمرده می شود که اندکی از آن ها، یاخته های به هم چسبیده و اندکی یاخته های خرد شده و گاه خرده یاخته های به هم چسبیده هستند. در ارزیابی داده ها تنها یاخته هایی که تک تک هستند جدا شدند. براساس هیستوگرام هایی حاصل از یاخته های جدا شده تکی، شمار یاخته ها در مراحل گوناگون به دست می آید. پس از به انجام رسیدن کارهای گفته شده روی یکایک فلاسک ها و تیمار یاخته ها با سه تکرار، شمار یاخته ها در مراحل گوناگون به دست آمد. جدول ۲ داده هایی که نشان دهنده درصد یاخته ها در این مراحل است را نشان می دهد.

قله دوم که کوتاه تر از قله پیشین است، یاخته هایی را که در مراحل G2 و M هستند نمایش می دهد. بازه ای از نمودار که در میان این دو جای می گیرد نشان دهنده مرحله S و بازه ای که پیش از قله نخست جای دارد، نشان دهنده یاخته هایی است که دچار مرگ برنامه ریزی شده یا نکروزیس شده اند [۱۵]. گفتنی است در بسیاری از کارهای پیشین که از این روش بهره برده اند، نامی از نکروزیس در این جا برده نشده و این شمار از یاخته ها، همه مرگ برنامه ریزی شده به شمار آمده اند. در این نمودار M1 نشان دهنده بخش پیش از G0 و G1 است که درباره آن گفته شد؛ M2 نشان دهنده مراحل G0 و G1، M3 نشان دهنده مرحله S و M4 نشان دهنده مراحل G2 و M است.

۲-۵- آنالیز آماری

همه آزمون ها با سه بار تکرار به انجام رسید و داده های گزارش شده، نشان دهنده میانگین این سه با افزایش و کاهش انحراف معیار است. برای آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS برای ارزش گذاری به آن ها، آزمون T-test برای نمونه های مستقل از هم به کار گرفته شد که داده های با مقادیر احتمال (P-value) کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

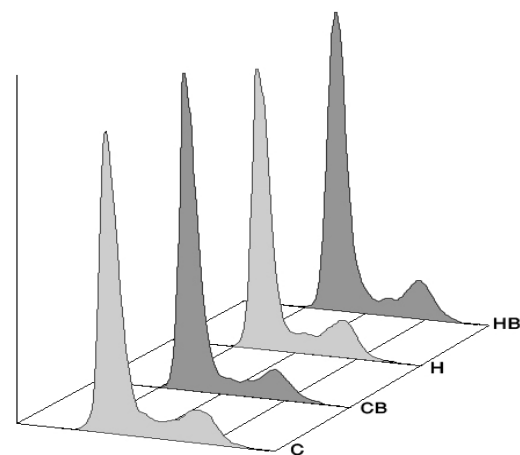
در بررسی دگرگونی چرخه یاخته ای که با کمک روش فلوسایتومتری به انجام رسید، چرخه یاخته ای یاخته های ناهماهنگ در رشد، پس از این که برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی تسلایی بودند، سنجیده شد. همان گونه که پیش از این گفته شد طول هریک از مراحل از روی تعداد یاخته هایی که در آن مرحله شمرده شده اند به دست آمد.

همان گونه که در جدول دیده می شود یاخته هایی که درون فلاسک ها بودند نخست به دو دسته بخش شدند. یک دسته دارای محیط کشت تنها و دسته دیگر دارای ۱۰۰

جدول ۲ درصد یاخته‌های بنیادی مغز استخوان در مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای پس از تیمار با پراکسید هیدروژن و میدان مغناطیسی؛ حروف گوناگون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در داده‌های مربوطه است.

گروه‌های آزمایشی	G0/G1	S	G2/M
C	$76/90 \pm 0/85^a$	$9/06 \pm 0/85^a$	$12/88 \pm 0/06^a$
CB	$79/12 \pm 1/51^b$	$8/59 \pm 1/07^a$	$11/04 \pm 0/95^b$
H	$75/96 \pm 0/23^c$	$10/39 \pm 0/59^b$	$12/38 \pm 0/15^c$
HB	$77/95 \pm 1/18^{ab}$	$8/73 \pm 0/77^{ac}$	$12/41 \pm 0/80^{ac}$

در شکل ۵ برای هر هیستوگرام دو قله دیده می‌شود. از آن‌جا که بیشتر یاخته‌ها در مراحل G0/G1 هستند، قله نخست نشان‌دهنده این مراحل است و قله دوم نشان‌دهنده یاخته‌هایی است که در مراحل G2/M هستند. میان این دو یاخته‌هایی جای می‌گیرند که در مرحله S هستند.



شکل ۵ هیستوگرام‌های مقایسه‌ای میانگین شمار مراحل گوناگون یاخته‌ای

همان‌گونه که در نمودار دیده می‌شود، پس از این‌که یاخته‌ها در میدان مغناطیسی جای گرفته‌اند در هر دو تیمار با پراکسید هیدروژن و بدون پراکسید هیدروژن، درصد یاخته‌ها در مرحله G0/G1 افزایش معنی‌داری داشته است. همچنین درصد یاخته‌ها در مرحله S نیز کاهش معنی‌داری یافته است.

۴- بحث

همان‌گونه که می‌دانیم تنها هدف یاخته از میتوز، پدید

آوردن دو یاخته زنده است که هر کدام دارای ژنومی همانند یاخته نخست باشد. پس جای شگفتی نیست که یاخته‌ها برای پیشبرد این کار، درستی فرایندهای درونی همچون همانندسازی DNA را در گذرگاه‌ها یا جایگاه‌های بازرسی ویژه‌ای بازنگری کنند. گذرگاه‌های گفته شده با پاسخ دادن به نشانه‌های برون یاخته‌ای فرایند زایش یاخته‌ای را کندتر کرده و بدین‌گونه یاخته را با پیرامون خود سازگارتر می‌کنند [۱].

در کنار این پدیده، اگر ناهنجاری‌ها در ساختار DNA به‌گونه‌ای باشد که نشان‌دهنده درستی فرایند همانندسازی نباشد، آن‌گاه نزدیک‌ترین گذرگاه، چرخه یاخته‌ای را کند می‌کند تا شاید یاخته با بازسازی و زدودن آن ناهنجاری برای پیشروی در چرخه آمادگی پیدا کند. با این کار، یاخته از پیش آمدن پیچیدگی‌هایی که ژنوم‌های ناهنجار در باز شدن رشته‌ها و رونویسی و کارهایی از این دست دارند، جلوگیری کرده و یاخته‌ها با کمترین آسیب به میتوز خواهند رسید [۱].

به عبارت دیگر، جایگاه‌های بازرسی یاخته‌ای را می‌توان سه دسته کرد. جایگاه‌هایی در پایان G1 و در سرتاسر S، DNA را از گزند آسیب نگهداری می‌کنند. جایگاه دیگری در G2 درستی همانندسازی و نبود آسیب‌های کروموزومی را برای رفتن یاخته به میتوز و جایگاه پایانی در میتوز، درستی فرایندهای میتوزی را پاسبانی می‌کند میدان‌های مغناطیسی نیز همچون جهش‌زاهای شیمیایی و پرتوهای یون‌زا، شاید جایگاه‌های بازرسی چرخه‌ای را راه‌اندازی کنند [۱۷]. این جایگاه‌های بازرسی می‌توانند برای مدتی جلوی پیشرفت چرخه را بگیرند؛ اما تنها جایگاهی که در پایان G1 است می‌تواند یاخته را از رشد بازدارد. از این رو هرگونه آسیب در ماده ژنتیکی یاخته می‌تواند باعث تجمع یاخته‌ها در مراحل پیش از این جایگاه‌های بازرسی شود.

جایگاه G1 بزرگ‌ترین نقش را در فرایندهای چرخه یاخته‌ای بازی می‌کند. در همین جاست که یاخته از راه‌های گوناگونی بسته به آسیب یاخته و برانگیزنده بیرونی یا درونی به پیرامون خود پاسخ می‌دهد. یک پاسخ، بردن یاخته به مرحله‌ای است که در آن چرخه از پیشروی بازداشته شود، همانند آن‌چه در G1 دیده می‌شود [۱۷].

در تحقیق حاضر میدان مغناطیسی ایستا با اثر خود بر جمعیت یاخته‌ای، باعث افزایش شمار یاخته‌ها در مرحله G1 شده است. از آن‌جا که طبق بررسی‌های متعدد پیشین پرتوهای یون‌ساز نیز با آسیب‌رسانی به DNA سلولی از راه مستقیم و غیرمستقیم باعث تأخیر در فرایند رشد سلولی می‌شوند [۱۸، ۱۹] میدان‌ها نیز ممکن است با طولانی کردن چرخه مکانیسم مشابهی را تداعی کنند؛ اما از آن‌جا که انرژی این میدان‌ها در حدی نیست که بتواند به‌طور مستقیم بر مولکول‌ها اثرگذار باشد، فرایندهای غیرمستقیم با واسطه‌های رادیکالی محتمل‌ترین مکانیسم به‌شمار می‌آید.

یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی در طولانی شدن مرحله G1 می‌تواند درگیر شدن پروتئینی به نام p53 باشد [۱۹]. این پروتئین، یک پروتئین راه‌انداز است به‌گونه‌ای که آغازگر رونویسی دیگر ژن‌ها است. برای نمونه در فرایند بازسازی در G1، p53 برانگیزنده تولید تنظیم‌کنندگان منفی است که کمپلکس G1-cyclin-Cdk را ناکارآمد می‌کنند [۲۰]. همان‌طور که می‌دانیم این گونه کمپلکس‌ها در پیشروی چرخه یاخته‌ای نقش بزرگی بازی می‌کنند و ناکارآمدی آن‌ها، از گذر یاخته به مرحله دیگر جلوگیری می‌کند.

آسیب به DNA در G1، یاخته را از پیشروی در چرخه باز می‌دارد و پروتئین p53 را پایدار می‌کند. p53 خود پیوسته به‌هنگام چرخه یاخته‌ای ساخته می‌شود و تغییر این پروتئین، باعث تثبیت غلظت آن در یاخته است [۱۹]. به‌هنگام آسیب DNA پروتئین در برابر این کاهش پایدارتر می‌شود که پیامد آن افزایش غلظت این پروتئین است و این افزایش غلظت آغازی بر رونویسی دیگر ژن‌های درگیر در ایست چرخه یاخته‌ای در G1 است.

۶- منابع

همچنین در مرحله S از چرخه یاخته‌ای نیز، کاهش در شمار یاخته‌های دو گروه از تیمار دیده شده است. از آن‌جا که بعید به نظر می‌رسد که میدان مغناطیسی با افزایش سرعت سنتز DNA باعث کوتاه شدن مرحله S شده باشد، این تغییر مختصر را می‌توان به طولانی شدن مرحله G0/G1 چرخه و کوچک شدن کسر یاخته‌های مرحله S به کل دانست. با توجه به این‌که یاخته‌ها همگام یا همزمان نبوده‌اند نمی‌توان به‌درستی در این باره سخنی به‌میان آورد. مطالعات دیگر با یاخته‌های همگام می‌تواند در درک بهتر اثر میدان بر تک‌تک مراحل یاخته‌ای راهگشا باشد.

از آن‌جا که حساسیت مراحل گوناگون چرخه به عوامل جهش‌زا متفاوت است، می‌توان از میدان‌های مغناطیسی به‌عنوان یک تیمار همراه ثانویه در کنترل زمان مراحل بهره برد و از این راه بر حساسیت یا عدم حساسیت بافت هدف و بافت‌های اطراف آن اثر گذاشت. از این رو مطالعات این‌چنینی می‌تواند در فراهم کردن بستری برای اثربخشی فرایندهای درمانی در بیماری‌هایی همچون سرطان و بالا بردن نسبت مرگ و میر یاخته‌های سرطانی به یاخته‌های سالم مؤثر باشد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی دانشگاه تربیت مدرس که انجام این مطالعه را ممکن ساخته‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند. ضمناً از همکاری بی‌دریغ سرکار خانم مرضیه فدایی کارشناس محترم آزمایشگاه بیوالکترومغناطیس قدردانی می‌شود.

- [1] Reynolds RJ, Schecker JA. Radiation, Cell Cycle, and Cancer. Los Alamos Science 1995; 23: 51-89.
- [2] Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. Prog Biophys Mol Biol 2005; 87: 213-23.

- [3] Barnes FS, Greenebaum B. Bioengineering and Biophysical Aspects of Electromagnetic Fields. 3th Edition, Taylor & Francis Group, New York, 2006; p: 106-230.
- [4] Kobayashi A, Kirschvink JL. Magnetoreception and electromagnetic field effects: Sensory

- perception of the geomagnetic field in animals and humans. *Adv Chem Ser* 1995; 250: 367-94.
- [5] Buemi M, Marino D, Di Pasquale G, Floccari F, Senatore M, Aloisi C, Grasso F, Mondio G, Perillo P, Frisina N, Corica F. Cell proliferation/cell death balance in renal cell cultures after exposure to a static magnetic field. *Nephron* 2001; 87(3): 269-73.
- [6] Zhang QM, Tokiwa M, Doi T, Nakahara T, Chang PW, Nakamura N, Hori M, Miyakoshi J, Yonei S. Strong static magnetic field and the induction of mutations through elevated production of reactive oxygen species in *E. coli* *soxR*. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 281-6.
- [7] Nakahara T, Yaguchi H, Yoshida M, Miyakoshi J. Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field. *Radiology* 2002; 224: 817-22.
- [8] Zmyslony M, Palus J, Jajte J, Dziubaltowska E, Rajkowska E. DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7mT magnetic fields (static or 50 Hz). *Mutat Res* 2000; 453(1): 89-96.
- [9] Hirose H, Nakahara T, Zhang QM, Yonei S, Miyakoshi J. Static magnetic field with a strong magnetic field gradient (41.7 T/m) induces C-Jun expression in HL-60 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; 39(8-9): 348-52.
- [10] Teodori L, Grabarek J, Smolewski P, Ghibelli L, Bergamaschi A, De Nicola M, Darzynkiewicz Z. Exposure of cells to static magnetic field accelerated loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. *Cytometry* 2002; 49(3): 113-8.
- [11] Jajte J, Grzegorzczak J, Zmyslony M, Rajkowska E. Effect of 7mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry* 2002; 57(2): 107-111.
- [12] Flipo D, Fournier M, Benquet C, Roux P, Le Boulair C, Pinsky C, LaBella FS, Krzystyniak K. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca^{2+} , and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 54: 63-76.
- [13] Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, Ghibelli L. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca^{2+} influx. *FASEB J* 1999; 13(1): 95-102.
- [14] Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4th Edition, John Willy & Sons. Inc., 2003; p: 101-214.
- [15] Celis JE. *Cell Biology*. 3th Edition, Vol.3, Academic Press, New York, 2004; 279-89.
- [16] Teresa S. & Hawley RG. *Flow Cytometry Protocols*. 2nd Edition, Humana Press, 2004; p: 345-54.
- [17] Padfield D, Rittscher J, Thomas N, Roysam B. Spatio-temporal cell cycle phase analysis using level sets and fast marching methods. *Med Image Anal* 2009; 13(1): 143-55.
- [18] Yata K, Esashi F. Dual role of CDKs in DNA repair: to be, or not to be. *DNA Repair (Amst)* 2009; 8(1): 6-18.
- [19] Lantto TA, Damien Dorman HJ, Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Tikhonov VP, Hiltunen R, Raasmaja A. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry* 2009; 112(4): 936-43.
- [20] Tkaczyk C, Huk OL, Mwale F, Antoniou J,

Zukor DJ, Petit A, Tabrizian M. The molecular structure of complexes formed by chromium or

cobalt ions in simulated physiological fluids. Biomaterials 2009; 30(4): 460-7.

کلونینگ و توالی‌یابی ژن

Leishmania homologue of receptors for activated C kinase

(LACK) لیشمانیا ماژور سویه استاندارد ایرانی

اوغل نیاز جرجانی^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، زهره شریفی^۳، عبدالحسین دلیمی^۴، زهیر محمد حسن^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

۴- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۵

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۶

چکیده

هدف: لیشمانیوزیس جزء بیماری‌های عفونی- انگلی مهم دنیاست که توسط تک یاخته‌های نسجی خونی داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. ژن LACK یک پروتئین ۳۶ کیلودالتونی است که در فرم‌های پروماستیگوت و آماسیتیگوت انگل، در گونه‌های مختلف لیشمانیا به مقدار بالایی وجود دارد. LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می‌کند؛ بنابراین این ژن برای تهیه آنتی‌ژن نوترکیب مناسب بوده و انتخاب خوبی به‌عنوان واکسن DNA علیه لیشمانیا ماژور است، این مطالعه با هدف کلون نمودن ژن LACK لیشمانیا ماژور ایران برای تولید پروتئین نوترکیب برای ساخت واکسن انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق DNA از سویه استاندارد ایرانی لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) استخراج و ژن LACK با استفاده از روش PCR تکثیر شد. سپس قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی تکثیر شده در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد. پلاسمید نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی سویه TG1 ترانسفورم و توالی‌یابی شد.

نتایج: آنالیز تعیین توالی ژن LACK لیشمانیا ماژور کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T مشخص کرد که قطعه‌ای ۹۳۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن LACK لیشمانیا ماژور است. این سویه ایرانی ۸۹ درصد با سویه موجود در بانک ژنی با کد LmjF28.2740 شباهت دارد. این کلونینگ با روش‌های PCR و برش آنزیمی تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان داد که این ژن با موفقیت تکثیر و کلون شده و از این کلون می‌توان کلون‌هایی در پلاسمید بیانی پروکاریوتی برای تهیه آنتی‌ژن نوترکیب و پلاسمید یوکاریوتی برای تهیه واکسن DNA استفاده کرد. این مطالعه راهی برای پیشرفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب برای مطالعات آینده است.

کلیدواژگان: کلونینگ، توالی‌یابی، لیشمانیا ماژور، LACK

۱- مقدمه

لیشمانیوزیس (Leishmaniasis) جزء بیماری‌های عفونی- انگلی مهم دنیاست که توسط تک یاخته‌های نسجی خونی داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا (*Leishmania*) از راسته کیتوپلاست‌داران ایجاد می‌شود.

این انگل از طریق نیش پشه خاکی ماده آلوده به میزبان مهره‌دار منتقل می‌شود. لیشمانیوزیس جلدی شایع در ایران معمولاً موجب مرگ نمی‌شود ولی آسیب‌های روحی، اجتماعی، اقتصادی را به دلایل مختلف مثل مزمن بودن دوره زخم، منظره جوشگاه ناپسند پوستی، به جای ماندن آثار زخم، احتمال عفونت ثانویه، بار سنگین اقتصادی درمان برای جامعه، طولانی بودن دوره درمان و عوارض ناشی از درمان را سبب می‌شود که می‌توان آن را از معضلات مهم مناطق بومی ایران به حساب آورد. لیشمانیوزیس یک مشکل بهداشت عمومی برای اکثر مناطق جهان به خصوص کشورهای جهان سوم و افراد مبتلا به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) و سایر بیماری‌های ناتوان کننده سیستم ایمنی در کشورهای پیشرفته است و این انگیزه قوی مطالعات تجربی در راستای بنیان روشی کامل برای کنترل آن بوده که بیش از صد سال از تاریخ این تلاش‌ها می‌گذرد [۱-۵].

در استفاده از روش‌های درمانی مختلف به علت مواجهه شدن با مشکلاتی مانند عود بیماری، مقاومت به داروها، عوارض جانبی داروها، ایجاد عفونت ثانویه باکتریایی، هزینه بالا، گزارش چندین مورد اپیدمی بیماری به خصوص در افراد با نقص ایمنی، تحقیقات را در ایجاد و گسترش داروهای جدید ضد لیشمانیا یا یک واکسن مناسب پیش می‌برد.

مطالعات و تجربیات مختلف نشان داده است که احتمال تهیه واکسنی مناسب علیه لیشمانیوزیس انسانی وجود دارد. مشاهدات و تلاش‌ها نشان داده است که تقویت سیستم ایمنی، اساس درمان لیشمانیوزیس است.

واکسیناسیون DNA بحث کاملاً جدیدی است و روش قدرتمندی برای القای پاسخ‌های ایمنی هومورال

و سلولی اختصاصی است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کد شده را بیان می‌کنند. واکسیناسیون ژنی پاسخ‌های ایمنی مؤثر و طولانی مدتی القاء می‌کنند که از طریق سیستم MHC-I (Major Histocompatibility Complex)، MHC-II، فراوری می‌شوند و خاطره ایمونولوژیکی را تحریک می‌کنند [۶-۱۰]. در دهه گذشته، پیشرفت چشمگیری در زمینه شناسایی کاندیدهای واکسن که می‌تواند پاسخ ایمنی محافظتی القاء کند، صورت گرفته است. بیشتر این کارها روی آنتی‌ژن‌های Ribosomal like Protein, P20, LmSTI1, Leif, PSA2, M2, Histon H1, P8, P4, A2, CP (A,B), GP64, GP63 متمرکز شده است که به عنوان گزینه‌های واکسن شناسایی شده‌اند ولی هیچ‌کدام ایجاد پاسخ‌های ایمنی کاملی نمی‌کنند اما در این میان LACK (Leishmania homologue of receptors for activated C kinase) یکی از کاندیدهای اصلی واکسن است که بیان قوی دارد [۱۱-۱۴].

LACK لیشمانیا ماژور (*L. major*)، پروتئین ۳۶ کیلودالتونی بوده و در فرم‌های پروماستیگوت (Promastigote) و آماستیگوت (Amastigote) و در گونه‌های مختلف لیشمانیا وجود دارد. همچنین همولوژی و شباهت زیادی با پروتئین RACK-I پستانداران دارد [۱۵-۱۷]. ژن کد کننده آنتی‌ژن LACK دارای ۹۳۹ جفت‌باز و فاقد ایترون است. ژن LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می‌کند [۱۸].

سلول‌های T علیه LACK، اینترلوکین ۴ (Interleukin 4: IL-4) تولید می‌کنند، بنابراین تحمیلی علیه LACK ایجاد می‌شود که نتیجه بیان ترانس‌ژنیک LACK در تیموس است. در نتیجه باعث مقاومت علیه عفونت لیشمانیوزیس می‌شود.

اگر در ایمنی‌زایی علیه لیشمانیوزیس، همراه با DNA LACK، IL-12 استفاده شود باعث تولید اینترفرون گاما (Interferon gamma: IFN- γ) و حفظ و اثربخشی پاسخ Th1 (T helper 1) می‌شود [۱۹].

هدف از این تحقیق، کلون کردن ژن LACK لیشمانیا ماژور داخل ناقل PTZ57R/T برای تهیه پلاسمید نو ترکیب ژن LACK بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- انگل لیسمانیا ماژور

در این تحقیق از سویه استاندارد ایرانی لیسمانیا ماژور تهیه شده از انستیتو پاستور که دارای کد بین‌المللی MRHO/IR/75/ER است، استفاده شد. برای تولید انبوه انگل و تهیه آنتی‌ژن، پروماستیگوت‌های انگل لیسمانیا ماژور در محیط RPMI-1640 که حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاو غیرفعال شده و ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین (Penicillin) در میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین (Streptomycin) در میلی‌لیتر است، در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود تا زمانی که تعداد انگل به میزان زیادی برسد و انگل در مرحله ایستا جمع‌آوری شود.

۲-۲- استخراج DNA

۱۰۰ میکرولیتر (در حدود 5×10^7) از پروماستیگوت‌های تغلیظ شده و شستشو شده با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) درون یک ویال ۱/۵ سی‌سی ریخته شد و با ۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز مخلوط شد. به‌منظور لیز شدن پروماستیگوت‌ها، ۱۰ میکرولیتر پروتیناز K به ویال اضافه شد و به‌مدت ۲ ساعت در بن‌ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۲۰، ۲۱]. استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم انجام شد [۲۲، ۲۳].

۲-۳- تکثیر DNA با روش PCR

محصول DNA استخراج شده از پروماستیگوت‌ها به‌عنوان الگو برای تکثیر قطعه ژن LACK به‌وسیله روش PCR استفاده می‌شوند. محصول واکنش PCR در ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ترکیبات زیر است: ۲/۵ میکرولیتر محصول DNA استخراج شده، ۱۲/۵ میکرولیتر Mix Taq، ۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرها (Primers) (۱۰ پیکومول در میکرولیتر). از جفت آغازگرهای زیر برای تکثیر قطعه ژن LACK به روش PCR استفاده شد:

آغازگر جلویی (Forward primer): 5'-ATT AAG CTT ATG AAC TAC GAG GGT CAC CTG AAG GG-3'

آغازگر برگشتی (Reverse primer): 5'-TTA GAA TTC TTA CTC GGC GTC GGA GAT-3'

آغازگر جلویی (Forward primer) دارای ۳۵ نوکلئوتید با جایگاه شناسایی برش آنزیمی HindIII و کدون شروع ATG است و آغازگر برگشتی (Reverse primer) دارای ۲۷ نوکلئوتید با جایگاه شناسایی برش آنزیم EcoRI و کدون خاتمه TAA است.

طبق برنامه زیر PCR انجام شد: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشتگی ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) ۳۰ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد و بسط (Extension) ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ سه مرحله اخیر ۳۰ چرخه تکرار شد و در نهایت واکنش PCR با بسط نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ دمای درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و از طریق رنگ‌آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) قابل مشاهده است. محصول DNA را می‌توان تحت تابش نور ماورای بنفش (Ultra Violet: UV) مشاهده کرد. نشانگر (Marker) ۱ کیلوگفت‌بازی برای تعیین کردن محصول PCR استفاده شد. محصول PCR، باند ۹۵۷ جفت‌بازی روی ژل توسط کیت استخراج DNA از ژل شرکت Fermentas از قطعات DNA کوچک‌تر، آغازگرها، نمک‌ها، نوکلئوتیدها و پروتئین‌ها از قبیل آنزیم Taq خالص می‌شود.

۲-۴- کلونینگ ژن LACK در پلاسمید pTZ57R/T

برش دادن و متصل کردن اساس کلون‌سازی است. برای کلون کردن ژن موردنظر، DNA پلاسمیدی خالص شده با آنزیم برش‌دهنده مناسب بریده شد. سپس به DNA هدف با انتهای مشابه متصل شد و یک پلاسمید نو ترکیب (Recombinant Plasmid) به‌وجود آمد [۲۲، ۲۳].

در این تحقیق به منظور کلونینگ ژن LACK از کیت کلونینگ T/A Cloning Kit شرکت Fermentas استفاده شد. محصول PCR خالص شده مطابق با دستورالعمل کیت در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد.

۲-۵- انتقال DNA به باکتری (Transformation)

باکتری مستعد (Competent Cell) از سویه TG1 باکتری اشرشیاکلی به روش کلرید کلسیم تهیه شد [۲۲]. برای انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری به روش زیر عمل شد:

۱- یک لوله میکروفیوژ (Microfuge) حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد از فریز ۷۰- درجه سانتی‌گراد در آورده و به مدت نیم ساعت درون ظرف یخ گذاشته شد تا به دمای صفر درجه سانتی‌گراد برسد. ۵- ۱۰ میکرولیتر محصول واکنش اتصال به آن اضافه شد و به آرامی با هم مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ گذاشته شد.

۲- مخلوط فوق در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله روی یخ منتقل شد.

۳- ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB (Lysogeny Broth) مایع بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار (Shaker incubator) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از دریافت DNA خارجی توسط سلول‌ها می‌توان آن‌ها را به‌طور مستقیم کشت داد.

۲-۶- غربال کردن (Screening) کلون‌های

باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

پس از انتقال DNA نوترکیب به درون سلول میزبان کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب مناسب، غربال و انتخاب شدند. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) همراه با یک القاء‌کننده آنزیم یعنی ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوسید (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) و

آمپی‌سیلین (Ampicillin) به آگار اضافه شد، کلونی‌های فاقد پلاسمید نوترکیب که در آن‌ها بتا‌گالاکتوزیداز سنتز می‌شود به رنگ آبی درآمدند؛ در حالی‌که کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، چون قادر به ساخت بتا‌گالاکتوزیداز نیستند به رنگ سفید بود.

۲-۷- استخراج پلاسمید از کلونی‌های آبی و سفید

استخراج پلاسمید از کلونی‌های سفید و آبی مطابق دستورالعمل ذکر شده در کیت استخراج پلاسمید شرکت Bionner آلمان انجام شد.

۲-۸- مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از

کلونی‌های آبی و سفید

پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های سفید (به‌علت وجود قطعه کلون شده در آن) سنگین‌تر از پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های آبی هستند برای این منظور پلاسمیدهای استخراج شده از پلاسمیدهای کلونی‌های آبی و سفید روی ژل آگارز ۰/۸ درصد لود (Load) و مقایسه شدند.

۲-۹- PCR قطعه LACK با استفاده از

پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-LACK

با استفاده از روش PCR وجود قطعه DNA خارجی را در حامل پلاسمیدی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تعیین شد و پلاسمیدهای نوترکیب مورد نظر از سایر پلاسمیدها جدا و انتخاب شد. به این منظور واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط ایجاد شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و ۳ میکرولیتر پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های سفید (۵۰-۱۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) به‌عنوان الگو انجام شد.

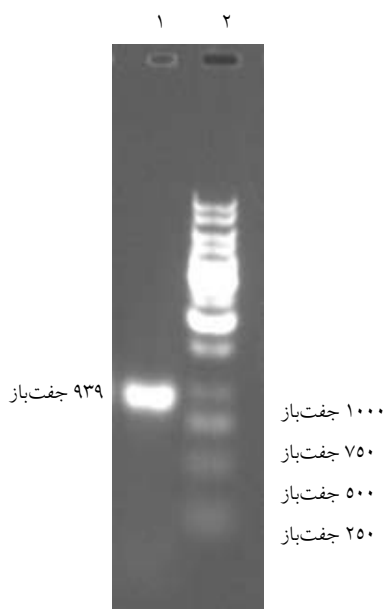
محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. نشانگر ۱ کیلوگفت‌بازی (Fermentas) برای تعیین کردن محصول PCR استفاده شد.

تعیین توالی ژن کلون شده به کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تشابهات و اختلافات با ژن TSA لیسمانیا ماژور مقایسه شد.

۳- نتایج

پروماستیگوت‌های لیسمانیا ماژور توسط بافر لیز و پروتئیناز K به‌خوبی لیز شده‌اند و DNA ژنومی با فنل-کلروفرم استخراج شده است.

نسبت جذب DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) برابر ۱/۹ است و DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد، نتایج نشان داد که غلظت DNA استخراج شده بالا است. تحت شرایط ایجاد شده برای انجام واکنش PCR فقط یک باند حدوداً ۹۳۹ جفت‌بازی روی ژل الکتروفورز ایجاد شده است که هم اندازه ژن LACK لیسمانیا ماژور است و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده است. پس شرایط تنظیم شده و آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن LACK اختصاصی هستند (شکل ۱).



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن LACK لیسمانیا ماژور با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱ درصد؛ ستون ۱: محصول PCR (قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی ژن LACK)، ستون ۲: نشانگر ۱ کیلو جفت‌بازی

۲-۱۰- برش آنزیمی DNA پلاسمیدی (Restriction mapping)

این روش برای بررسی وجود قطعه DNA خارجی در پلاسمید به‌کار می‌رود. براساس جایگاه‌های برش آنزیم روی DNA حامل، قطعات حاصل از هضم آنزیمی پیش‌بینی شد. به‌همین منظور DNA پلاسمیدی نو ترکیب همزمان با DNA پلاسمید حامل (به‌عنوان شاهد) توسط دو آنزیم برش داده شد. سپس نمونه‌های برش‌یافته همراه با یک نشانگر وزن مولکولی الکتروفورز بررسی شد [۲۲].

برای این منظور دو برش آنزیمی متوالی، هریک به حجم ۲۰ میکرولیتر در یک لوله میکروفیوژ استریل شامل مواد زیر انجام شد و پس از ورتکس (Vortex) کردن، به‌مدت ۱-۲ ساعت یا شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

DNA پلاسمیدی (۳-۱ میکروگرم) ۵ میکرولیتر

بافر ۱۰x ۲ میکرولیتر

آنزیم برش‌دهنده *EcoRI* (۱۰ واحد) ۱ میکرولیتر

آب مقطر ۱۲ میکرولیتر

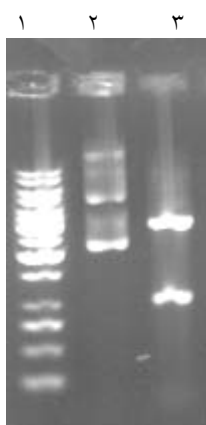
برش آنزیمی دوم با یک میکرولیتر *HindIII* به‌همین روش و روی ۱۰ میکرولیتر محصول برش‌خورده با آنزیم *EcoRI*، ۷ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر بافر آنزیم انجام شد.

همه محصولات برش آنزیمی روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد و توسط کیت استخراج پلاسمید از ژل شرکت Fermentas استخراج شد [۲۲، ۲۴، ۲۵].

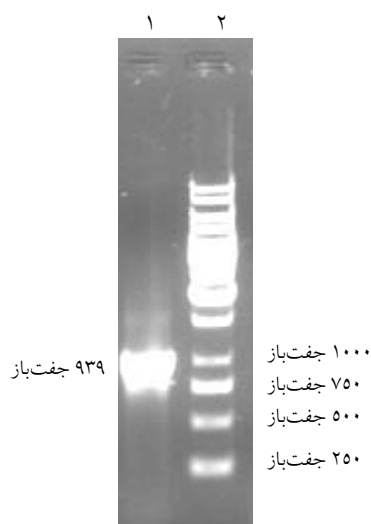
۲-۱۱- تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing)

در این تحقیق به‌منظور تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T، ابتدا پلاسمیدهای موجود در باکتری‌های کلونی سفید، به‌منظور پیشگیری از هر گونه آلودگی، توسط کیت شرکت Bioneer آلمان مطابق با دستور کار شرکت سازنده کیت و با به روش Alkaline lysis استخراج شد و برای تعیین توالی به شرکت Gene Fanavaran ارسال شد. سپس نتیجه

آنالیز تعیین توالی ژن LACK لیشمانیا ماژور کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast مشخص شد که قطعه‌ای ۹۳۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن LACK لیشمانیا ماژور است. این سویه ایرانی MRHO/IR/75/ER ۸۹ درصد با بانک ژنی شباهت دارد (شکل ۵).

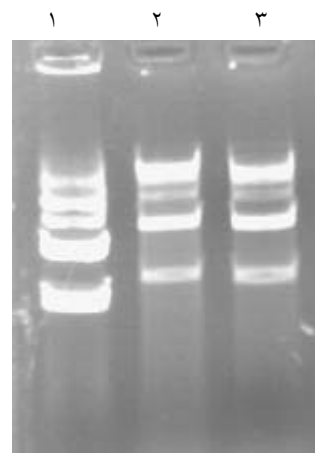


شکل ۳ الگوی الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/T-LACK روی ژل آگارز؛ ستون ۱: نشانگر ۱ کیلو جفت‌بازی، ستون ۲: pT-LACK که در معرض آنزیم قرار نگرفته است، ستون ۳: pTZ57R/T-LACK که با آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* بریده شده است.



شکل ۴ الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/T-LACK روی ژل آگارز ۱ درصد؛ ستون ۱: محصول PCR (۹۳۹ جفت‌باز) با استفاده از پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/T-LACK؛ ستون ۲: نشانگر ۱ کیلو جفت‌بازی

مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی آبی pTZ57R/T و کلونی سفید pTZ57R/T-LACK بعد از اتصال نشان داد باندهای پلاسمید PT-LACK در مقایسه با باندهای استخراج شده از کلونی‌های آبی pTZ57R/T روی ژل آگارز بالاتر قرار داشتند پس پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی سفید از پلاسمیدهای آبی سنگین‌تر هستند (شکل ۲)؛ پس می‌توان نتیجه گرفت که قطعه LACK در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است.



شکل ۲ مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید و آبی؛ ستون ۱: پلاسمید pTZ57R/T، ستون‌های ۲ و ۳: پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/T-LACK

به‌طور کلی نتایج حاصل از برش‌های آنزیمی نشان داد که اگر پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌های کلونی سفید pTZ57R/T-LACK به‌وسیله آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* بریده شوند، یک باند ۹۳۹ جفت‌بازی بریده و جدا می‌شود که هم اندازه ژن LACK لیشمانیا ماژور است. بنابراین ژن LACK درون پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است (شکل ۳).

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR با پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/T-LACK به‌همراه آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و شرایط ایجاد شده نشان داد که قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی ژن LACK از روی پلاسمید نو ترکیب، تکثیر شده است. پس ژن LACK در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است (شکل ۴).

فرد مبتلا می‌شود [۲۶-۲۹].

از سال ۱۹۶۰ تا ۱۹۸۰ تحقیقات برای تولید واکسن بر علیه لیشمانیوزیس در کشورهای مختلف با ایجاد لیشمانیازسیون (Leishmanization) (استفاده از انگل‌های زنده) شروع شد [۳۰، ۳۱].

به دنبال تحقیقات کار روی واکسن‌های پروتئینی و سپس غیرپروتئینی (Lipophosphoglycan: LPG) ادامه یافت که باز هم به علت عدم دستیابی به ایمنی کامل بحث جدید واکسن DNA (DNA Vaccine) آغاز شد که روش قدرتمندی برای القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال اختصاصی است. با تزریق پلاسمید DNA برهنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کد شده را بیان می‌کند [۳۰-۳۲]. تحقیقات نشان داده است که واکسن DNA به صورت مخلوطی از چند ژن حتی بدون ادجوانت (Adjuvant) به عنوان جایگزینی مناسب برای واکسن‌های پروتئینی به علت ایجاد حفاظت طولانی مدت بر علیه لیشمانیوزیس پوستی قلمداد می‌شود. LACK لیشمانیا ماژور پروتئین ۳۶ کیلودالتونی بوده و در فرم‌های پروماستیگوت و آماستیگوت و در گونه‌های مختلف لیشمانیا وجود دارد، همچنین همولوژی و شباهت زیادی با پروتئین RACK-1 (activated protein kinase C receptor) پستانداران دارد [۱۵-۱۷].

واکسیناسیون ژنی پاسخ‌های ایمنی مؤثر، قوی و طولانی مدت را القاء می‌کند زیرا آنتی‌ژن‌های ایمونولوژیک را مهیا می‌کنند و از طریق MHC-I و MHC-II عرضه می‌شوند و خاطره ایمونولوژیکی را تحریک می‌کنند. یک واکسن ایده‌آل و مناسب واکسینی است که علاوه بر بی‌خطر بودن و ایجاد مصونیت، ارزان و دارای خاصیت ایمنی بالا و طولانی مدت و ساخت و تولید راحت و آسان باشد. همچنین در داخل ژنوم سلولی قرارنگیرد (Non-integrating) و جزئی از آن نشود، همچنین آنتی‌بادی علیه ناقل واکسن نباشد (توسط ایمنی که از قبل در بیمار ایجاد شده است). این واکسن‌ها شامل ناقل‌های پلاسمیدی است که ژن‌های هترولوگوس قرار داده شده تحت کنترل پروموتور یوکاریوتی هستند و باعث القای پاسخ‌های

MRHO/IR/75/ER

MNYEGHLKGHGHWVTSACPQQAGSYIKVV
STSRDGTASWKANPDRHSAEDNYGIPDHR
Friedlin

MNYEGHLKGHRGWVTSACPQQAGSYIKVV
STSRDGTASWKANPDRHSVDSYGLPNHR

MEGHSGFVSCVSLAHATDYALTASWDHAIR
MWDLRTGQSQRKFLKHTKDVLAFAFSPDDR
LEGHTGFVSCVSLAHATDYALTASWDRSIRM
WDLRNGQCQRKFLKHTKDVLAFAFSPDDR

LIASAGRDSVIRVWNVAGECMHEFLRDGHED
WVSSICFSPSLDLPIVASGSDWNTIKVWN
LIVSAGRDNVIRVWNVAGECMHEFLRDGHED
WVSSICFSPSLEHPVVSGSDWNTIKVWN

VNEGKCVHTLRGHKNYVSTVTVSPDGSLCAS
GGKDGSAALLWDLNNGEQLFSIPVESPINQ
VNGGKCERTLKGHSNYVSTVTVSPDGSLCAS
GGKDGSAALLWDLSTGEQLFKINVESPINQ

IAFSPNRFWMCVATEKSL
IAFSPNRFWMCVATERSL

شکل ۵ نتایج Blast اسیدآمینه‌های LACK لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) در مقایسه با اسیدآمینه LACK با شماره دسترسی LmjF28.2740 در بانک ژنی

۴- بحث

لیشمانیوزیس بیماری وسیع‌الطیف انگلی است که کم و بیش از سراسر جهان گزارش می‌شود. تاکنون واکسن یا داروی مناسب برای کنترل انگل و نیز روش شیمیایی مناسب برای مبارزه قاطع با ناقل آن ارائه نشده است.

بیماری لیشمانیوزیس به علت ناتوانی در درمان کامل آن با روش‌های درمانی موجود و عود مجدد بیماری و عفونت‌های ثانویه باکتریایی زخم و عوارض جانبی، مقاومت، هزینه بالای آن‌ها در درمان بیماری، همچنین عفونت فرصت‌طلب بودن بیماری در افراد با نقص ایمنی و شیوع فراوان، انتشار و پراکندگی بیماری در نقاط مختلف کشور (نوع جلدی) و مرگ و میر بالای بیماری در صورت عدم درمان به موقع (نوع احشائی) دارای اهمیت فراوان است. بیماری‌های ناتوان کننده دستگاه ایمنی مانند AIDS سبب بازگشت و عود بیماری در

CD_4^+ ، CD_8^+ می‌شوند. واکسیناسیون ژنی مکانیسمی را برای دستیابی به سنتز آنتی‌ژن به شکل درون سلولی مهیا می‌کند و سیستم ایمنی را شبیه به عفونت ویروسی تحریک می‌کند. این در حالی است که آنتی‌ژن‌های محلول مثل پروتئین‌های نوترکیب معمولاً فقط پاسخ هومورال را القاء می‌کنند. واکسن‌های پروتئینی نوترکیب به علت هزینه زیاد طی فرآیند تولید، دشوار بودن خالص‌سازی تاخوردگی ناصحیح و القای ضعیف سلول‌های CD_8^+ T چندان مورد توجه نیستند [۳۰-۳۲]. واکسن‌های DNA در مقایسه با واکسن‌های رایج نوترکیب پروتئینی یا ویروسی و باکتریایی بنا به دلایل زیر مزیت دارند: ۱- ساخت و تولید آن‌ها راحت‌تر بوده و بی‌خطر و امن‌تر هستند؛ ۲- بیان طولانی مدت آنتی‌ژن توسط این واکسن‌ها باعث تحریک مداوم سیستم ایمنی می‌شود؛ ۳- این واکسن‌ها پاسخ ایمنی متفاوت و با کیفیتی ایجاد می‌کنند؛ ۴- نیاز به تخلیص و تولید پروتئین نیست؛ ۵- وقتی این واکسن‌ها با پلاسمیدهای کد کننده سیتوکین‌ها (Cytokines) (اگزوژن (Exogenous) مانند IL-12، IL-7) یا کموکاین‌ها (Chemokines) به‌عنوان تنظیم کننده پاسخ‌های ایمنی یا مولکول‌های محرک ایمنی یا ادجوانت‌های ساختگی مانند MPL (Monophosphoryl Lipid) همراه باشند یا این‌که از چند ژن با هم استفاده شود، احتمال افزایش یا تبدیل پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن کد شونده توسط DNA وجود دارد و کلاً واکسن‌های فوق که بر پایه خودتکثیری هستند به عبارتی Self Replicate هستند، نسبت به واکسن‌های روتین و معمولی (واکسن‌های که از پروتئین‌های نوترکیب، ویروس‌ها یا باکتری‌ها استفاده می‌شوند) اثر بیشتر و طولانی مدتی دارند. همچنین مقاوم به گرما بوده و یکنواخت (Homogenized) هستند [۲۹، ۳۳-۳۵].

موش‌های Balb/c مستعدی که از طریق زیرجلدی با DNA LACK ایمن شده‌اند، با پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور مبارزه می‌کنند. اثر حفاظتی که DNA LACK ایجاد می‌کند، مشابه اثر حفاظتی بود که پروتئین rIL-12+LACK ایجاد می‌کند ولی اثر حفاظتی که DNA LACK ایجاد

می‌کند بهتر از اثر حفاظتی بود که پروتئین LACK به تنهایی (بدون rIL-12) ایجاد می‌کند. در موش‌های ایمن شده با DNA LACK، کنترل پیشرفت بیماری‌ها و تعداد انگل با افزایش تولیدات IFN- γ اختصاصی علیه آنتی‌ژن در ارتباط است [۱۸]. LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می‌کند [۱۸].

سلول‌های T علیه LACK، IL-4 تولید می‌کنند، بنابراین تحملی (Tolerance) علیه LACK ایجاد می‌شود که نتیجه بیان ترانسژنیک LACK در تیموس است. در نتیجه باعث مقاومت علیه عفونت لیشمانیوزیس می‌شود. فعال شدن سریع سلول‌های T علیه LACK، به ترشح سیتوکین‌های اصلی کمک می‌کند که در تبدیل شدن سلول T به فنوتیپ نوع Th2 لازم است.

اگر در ایمنی‌زایی علیه لیشمانیوزیس، همراه با DNA LACK، IL-12 استفاده شود باعث تولید IFN- γ و حفظ و اثربخشی پاسخ Th1 می‌شود. ایمنی‌زایی با DNA LACK از راه زیرجلدی پاسخ ایمنی حفاظتی خوبی علیه لیشمانیوزیس ایجاد می‌کند [۳۶-۳۸].

در این تحقیق، آنالیز تعیین توالی ژن LACK لیشمانیا ماژور کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast نشان داد که قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و هیچ اینترونی در ژن مورد نظر وجود ندارد و این ژن دارای یک اگزون است. همچنین ژن کلون شده، ژن LACK لیشمانیا ماژور است و ژن LACK این سویه ایرانی MRHO/IR/75/ER با ژن LACK سویه‌های دیگر با شماره‌های دسترسی AF363975_1، LmjF28.2740 در بانک ژنی از نظر توالی ۸۹ درصد شباهت و در ۲۸ اسیدآمیننه تفاوت دارد. این شباهت نشانگر این است که توالی ژن LACK در سویه‌های مختلف لیشمانیا ماژور به‌طور کامل حفظ شده است. نتایج حاصل از PCR ژن LACK نشان داد که هیچ ژن دیگری غیر از LACK تکثیر نشده است، پس آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن LACK اختصاصی هستند. پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی باکتری‌ها (پلاسمید

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان به این وسیله از پرسنل محترم بخش تحقیقات ویروس‌شناسی سازمان انتقال خون تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از آقای دکتر صدرایی مدیر گروه محترم گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس و خانم قاسمی‌نیکو کارشناس محترم گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس سپاسگزاری می‌گردد.

نو ترکیب) تعیین توالی شد.

کلونینگ قطعه LACK در پلاسمید pTZ57R/T (برای تکثیر ژن) با روش‌های PCR و برش آنزیمی تأیید شد و همه روش‌ها بیانگر کلون شدن قطعه فوق در پلاسمیدهای ذکر شده، بودند.

این مطالعه راهی برای پیشرفت تولید پلاسمیدهای نو ترکیب و تهیه واکسن DNA علیه لیشمانیا ماژور برای مطالعات آینده است.

۶- منابع

- [1] Ardehali S. Leishmania parasit and leishmaniasis. University publication center, 1985; p: 50-100. (Persian)
- [2] Garsialin S, Brookes D, Translation: Fallah M. Medical parasitology and diagnose methods in parasitology. Hamedan Medical University Publication 1992; p: 123-30. (Persian)
- [3] Nadim A. Cutaneous leishmaniasis in Tehran sides. General Med J 1966; 272-274. (Persian)
- [4] Asilian A. Cutaneous leishmaniasis and cure methods and prevention. Esfahan Med Univ 1992, p: 40-52. (Persian)
- [5] Momeni A, Javaheri A. Cure effects study and side charges of Glukantin in cutaneous leishmaniasis. 1992; p: 16-7. (Persian)
- [6] Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTII leishmanial fusion protein confers protection against Leishmania major infection in susceptible Balb/c mice. J Infect Immun 2002; 70(6): 2828-36.
- [7] Monnerat S, Martinez-Calvillo S, Worthey E, Myler PJ, Stuart KD, Fasel N. Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of Leishmania major. Mol Biochem Parasitol 2004; 134(2): 233-43.
- [8] Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of Leishmania major that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. J Immunol 1996; 157(11): 5034-41.
- [9] Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. J Infect Immun 1998; 66(7): 3279-89.
- [10] Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarlioni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De

- Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005; 309(5733): 436-42.
- [11] Mauël J. Vaccination against leishmania infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; 2(3): 201-26.
- [12] Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, Evans-Davis K. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1999; 163(8): 4481-8.
- [13] Wang S, Liu X, Fisher K, Smith JG, Chen F, Tobery TW, Ulmer JB, Evans RK, Caulfield MJ. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium-or aluminum phosphate. *Vaccine* 2000; 18(13): 1227-35.
- [14] Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 151-77.
- [15] Kemp M, Hey AS, Bendtzen K, Kharazmi A, Theander TG. Th1-like human T cell clones recognizing *Leishmania gp63* inhibit *Leishmania major* in human macrophages. *Scand J Immunol* 1994; 40(6): 629-35.
- [16] Coelho EF, Tavares CA, Lima Kde M, Silva CL, Rodrigues JM jr, Fernandes AP. *Mycobacterium hsp65* DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against *Leishmania (Leishmania) major* infection. *Parasitol Res* 2006; 98(6): 568-75.
- [17] Pérez-Jiménez E, Kochan G, Gherardi MM, Esteban M. MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes Infect* 2006; 8(3): 810-22.
- [18] Maillard I, Launois P, Himmelrich H, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, Louis JA. Functional plasticity of the LACK-reactive Vbeta4-Valpha8 CD4(+) T cells normally producing the early IL-4 instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/ c mice. *Eur J Immunol* 2001; 31(4): 1288-96.
- [19] Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(15): 8427-32.
- [20] Skeiky YA, Ovendale PJ, Jen S, Alderson

- MR, Dillon DC, Smith S, Wilson CB, Orme IM, Reed SG, Campos-Neto A. T cell expression cloning of a Mycobacterium tuberculosis gene encoding a protective antigen associated with the early control of infection. *J Immunol* 2000; 165(12): 7140-9.
- [21] Kahl LP, Scott CA, Lelchuk R, Gregoriadis G, Liew FY. Vaccination against murine cutaneous leishmaniasis by using Leishmanias major antigen/liposome. Optimization and assessment of the requirement for intravenous immunization. *J Immunol* 1989; 142(12): 4441-9.
- [22] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition, Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989; p: 1659.
- [23] Cobb BD, Clarkson JM. A simple procedure for optimizing the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(18): 3801-5.
- [24] Gassra W, Hansen K. Ligation of DNA with T4 DNA ligase. In: Walkar JM, editor. *Methods in Molecular Biology Vol.2 Nucleic Acids*. Humana press, 1984; Chapter 32, p: 225-30.
- [25] Feliciello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli. *Anal Biochem* 1993; 212(2): 394-401.
- [26] Dumonteil E, McMahon-Pratt D, Price VL. Report on the fourth TDR/IDRI meeting on second generation vaccine against leishmaniasis. Merida, Yucatan, Mexico, May 1-3, 2001. *Rev Biomed* 2002; 13(1): 53-8.
- [27] Brodskyn C, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2(5): 705-17.
- [28] Reed SG. Leishmaniasis vaccination: targeting the source of infection. *J Exp Med* 2001; 194(3): 331-42.
- [29] Wolff JA, Malone RW, Williams P, Ascadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247(4949 Pt 1): 1465-8.
- [30] Tighe H, Corr M, Roman M, Raz E. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today* 1998; 19(2): 89-97.
- [31] Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 2003; 21(19-20): 2474-84.
- [32] Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infection: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol* 2001; 100(1-2): 3-12.
- [33] Gafurov IM. Experience in controlling and preventing zoonotic cutaneous leishmaniasis in Uzbekistan. *Med Parazitol (Mosk)* 1999; (1): 58-9.
- [34] Bray RS, Modabber F. The history of leishmaniasis. In: Gilles HM, editor. *Protozoal Diseases*. New York & London: Hodder Arnold Publisher 2000; p: 414-9.
- [35] Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7(4): 375-81.
- [36] Ahmed SB, Bahloul C, Robbana C, Askri S,

- Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine* 2004; 22(13-14): 1631-9.
- [37] Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, Seder RA. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1997; 186(7): 1137-47.
- [38] Tapia E, Pérez-Jiménez E, López-Fuertes L, Gonzalo R, Gherardi MM, Esteban M. The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microbes Infect* 2003; 5(2): 73-84.

تشخیص حذف‌های ناشناخته‌های ژن‌های آلفا-گلوبین در ناقلین

آلفا-تالاسمی با استفاده از روش Real-time PCR

سمیه جمالی^۱، رضا مهدیان^۲، مینا حیات‌نوسعد^۳، صادق باباشاه^۴، فرشته مریمی^۵، مرتضی کریمی‌پور^۶، بهناز زربخش^۶،
فائزه رحیمی‌نژاد^۷، سیروس زینلی^{۸*}

- ۱- کارشناس، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۳- کارشناس ارشد، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۵- پزشک عمومی، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۶- دکترای دامپزشکی، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۷- کارشناس، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۸- دانشیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۶

چکیده

هدف: آلفا-تالاسمی یکی از شایع‌ترین اختلالات هموگلوبین در جهان محسوب می‌شود و در اکثر موارد در نتیجه ایجاد حذف در یک یا هر دو ژن آلفا-گلوبین اتفاق می‌افتد. حذف‌های شناخته شده آلفا-گلوبین مانند حذف‌های ۳/۷، ۴/۲، ۵/۵، ۶/۴ و Med را می‌توان با روش Real-time PCR چندگانه تشخیص داد. با این وجود تعدادی از حذف‌های ناشناخته در این ژن وجود دارند که با استفاده از روش‌هایی مانند روش فوق و همچنین روش تعیین توالی قابل تشخیص نخواهند بود. در این تحقیق از روش Real-time PCR به منظور تشخیص وجود یا عدم وجود حذف‌های ناشناخته استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: روش Real-time PCR مبتنی بر استفاده از رنگ سایبرگرین I به منظور تکثیر ژن‌های α_1 ، α_2 و همچنین ژن مرجع CLCN7 انجام پذیرفت و آنالیز داده‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه برای تعیین میزان ژنی انجام شد.

نتایج: نتایج به دست آمده با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه نسبت 0.90 ± 0.16 را برای افراد نرمال و نسبت 0.32 ± 0.15 را برای افراد ناقل حذف هتروزیگوت در ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین نشان می‌دهد. همچنین آنالیز منحنی ذوب اختصاصیت تکثیر ژن‌های مورد نظر را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: روش Real-time PCR روشی ساده، سریع و مطمئن بوده و می‌توان از آن برای شناسایی حذف‌های ناشناخته در ناقلین آلفا-تالاسمی استفاده نمود.

کلیدواژگان: آلفا-تالاسمی، Real-time PCR، چرخه آستانه

* نشانی مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، گروه ژنتیک

Email: sirouszeinali@yahoo.com

۱- مقدمه

تالاسمی (Thalassemia) یکی از شایع‌ترین اختلالات ارثی در سنتز هموگلوبین است که با فقدان یا کاهش سنتز زنجیره‌های گلوبین همراه است. این بیماری در ۶۰ کشور جهان و با فراوانی بیشتر در مناطق مدیترانه، خاورمیانه، شبه قاره هند، آسیای جنوب شرقی و غرب آفریقا شیوع دارد [۱]. کشور ایران نیز از جمله کشورهای قرار گرفته روی کمربند تالاسمی در سطح جهان محسوب می‌شود؛ بنابراین تشخیص پیش از تولد این بیماری از اولویت‌های بهداشتی در ایران به‌منظور جلوگیری از تولد نوزادان مبتلا است و از سال ۱۳۷۶ به اجرا در آمده است [۲، ۳].

هرگاه سنتز زنجیره‌های آلفا یا بتا-گلوبین دچار اشکال شود، تعادل مقداری زنجیره‌های آلفا و بتا-گلوبین به هم خورده و با توجه به مقدار کاهش تولید از هر یک از این دو ژن، آثار فنوتیپی متفاوتی مشاهده می‌شود. در مقابل در صورت ایجاد نقص در ژن بتا-گلوبین، رابطه درصدی زنجیره‌های بتا و دلتا-گلوبین تغییر کرده و باعث افزایش سطح هموگلوبین A2 (Haemoglobin Adult-2: HbA2) (محصول ژن‌های آلفا و دلتا-گلوبین) می‌شود. چنین پدیده‌ای با کاهش محصول زنجیره‌ی آلفا-گلوبین اتفاق نمی‌افتد؛ یعنی در ناقلین آلفا-تالاسمی سطح HbA2 در حد طبیعی است. این در حالی است که اختلالات ژنتیکی در تولید زنجیره بتا-گلوبین، ساختن هر دو نوع هموگلوبین HbA و هموگلوبین جنینی (Haemoglobin Fetal: HbF) را مختل می‌کند. زنجیره‌های آلفا-گلوبین تجمع نیافته که در اثر عدم تعادل در سنتز زنجیره‌های آلفا-گلوبین و زنجیره فاقد آلفا-گلوبین ایجاد می‌شوند، به‌صورت ذرات متراکم (Inclusion) رسوب می‌کنند. این چنین ذرات حاوی زنجیره‌های آلفا-گلوبین به پیش‌سازهای اریتروئید در مغز استخوان و طحال آسیب رسانده و سبب خون‌سازی غیر مؤثر خواهند شد [۱، ۴].

برخلاف بتا-تالاسمی که اکثراً از جهش‌های نقطه‌ای ایجاد می‌شود، اکثر جهش‌های آلفا-تالاسمی ناشی از وقوع حذف در یک یا هر دو ژن آلفا-گلوبین هستند. شایع‌ترین حذف‌های

معمول ایجاد کننده آلفا-تالاسمی، حذف‌های $\alpha^{-3,7}$ ، $\alpha^{-4,2}$ ، $\alpha^{-20,5}$ ، α^{-MED} و α^{-SEA} هستند. با استفاده از روش Gap PCR چندگانه (Multiplex Gap PCR) امکان تعیین حذف‌های مختلف در یک واکنش منفرد وجود دارد. جهش‌های نقطه‌ای را نیز می‌توان از طریق روش ARMS (Amplification Refractory Mutation System) یا روش‌های مشابه و همچنین تعیین توالی مستقیم DNA شناسایی نمود [۵-۷].

در زمینه تشخیص مولکولی آلفا-تالاسمی موارد متعددی ناشی از وجود حذف‌های ناشناخته در ژن آلفا-گلوبین گزارش شده است که به‌علت عدم مشخص بودن دامنه حذف، با استفاده از روش Gap PCR قابل شناسایی نیستند. روش Real-time PCR به‌عنوان روشی مناسب در زمینه بررسی تعداد نسخه‌های ژنی در مورد حذف‌های ناشناخته در خوشه ژنی آلفا-گلوبین قابل بررسی است. اساس این سیستم مبتنی بر سنجش کمی نسخه‌های ژنی در طول مرحله تصاعدی از واکنش PCR از طریق سنجش میزان نشر نور فلورسانس است. در این سیستم تشخیصی یک رنگ فلورسنت طی واکنش تکثیر، متناسب با میزان محصولات هر چرخه آزاد شده و میزان نشر نور فلورسانس توسط نمایانگر شناسایی و ثبت می‌شود [۸].

در تحقیق حاضر، سیستم Real-time PCR برای آنالیز ژن‌های آلفا-گلوبین با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین I (SYBR Green-I) توسعه و بهینه‌سازی یافت و بررسی تعداد نسخه‌های ژنی در ژن‌های α_1 و α_2 در ناقلین‌های آلفا-تالاسمی با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold cycle: C_T) که به روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ نیز موسوم است، بررسی شد. آستانه نشان‌دهنده میزانی از محصول است که در آن همه نمونه‌ها به‌صورت تصاعدی تکثیر می‌یابند و C_T چرخه‌ای است که در آن افزایش معنی‌داری در علامت فلورسنت در طول مرحله تکثیر تصاعدی PCR مشاهده می‌شود. بدیهی است C_T به‌طور معکوس با مقدار اولیه DNA ژنومی متناسب است [۸، ۹].

جدول ۱ شاخص‌های خون‌شناسی در افراد مطالعه شده

نمونه	تعداد	RBC* (میکرولیتر/ $\times 10^6$)	Hb (دسی لیتر/گرم)	MCV (فمتولیت)	MCH (پیکوگرم)	HbA2** (درصد)	HbF*** (درصد)
نرمال	۱۵	$4/56 \pm 0/35$	$13/4 \pm 1/06$	$86/89 \pm 1/94$	$29/36 \pm 0/97$	$2/9 \pm 0/85$	$1/03 \pm 0/45$
هتروزیگوت حذف Med	۴	$7/02 \pm 0/65$	$12/48 \pm 0/99$	$79/05 \pm 1/6$	$20/95 \pm 0/55$	$2/26 \pm 0/55$	$0/33 \pm 0/11$
هتروزیگوت حذف ۵/۲۰ کیلوبازی	۴	$7/52 \pm 0/43$	$13/52 \pm 1/47$	$79/05 \pm 1/8$	$20/74 \pm 1/12$	$2/14 \pm 0/24$	$0/52 \pm 0/26$
هتروزیگوت حذف ۲/۴ کیلوبازی	۱	$5/45 \pm 0/35$	$13/95 \pm 1/2$	$77/53 \pm 3/11$	$25/75 \pm 0/35$	$2/4 \pm 0/14$	$0/35 \pm 0/21$
هتروزیگوت حذف ۳/۷ کیلوبازی	۸	$5/27 \pm 0/56$	$13/23 \pm 1/18$	$79/32 \pm 3/31$	$25/31 \pm 1/12$	$2/46 \pm 0/27$	$0/44 \pm 0/18$
هموزیگوت حذف ۳/۷ کیلوبازی	۳	$7/24 \pm 0/76$	$12/92 \pm 2/28$	$70/92 \pm 1/87$	$21/42 \pm 2/84$	$2/08 \pm 0/71$	$0/32 \pm 0/08$
موارد مشکوک به وقوع حذف	۶۰	$5/64 \pm 0/95$	$13/31 \pm 1/67$	$70/05 \pm 3/2$	$20/42 \pm 1/56$	$2/05 \pm 0/32$	$0/36 \pm 0/1$

RBC*: سلول قرمز خونی؛ HbA2** ($\alpha 2\delta 2$)؛ HbF*** ($\alpha 2\gamma 2$)مقادیر ذکر شده در جدول نمایانگر میانگین $\pm$ انحراف از معیار (mean $\pm$ SD) است.

جدول ۲ توالی آغازگرهای الیگونوکلوئیدی به کار گرفته شده در Real-time PCR

آغازگر	توالی آغازگر	موقعیت آغازگر بر روی ژن	طول قطعه تکثیری (جفت باز)
α_1 - F	5'-ACGCCTCCCTGGACAAGTTC-3'	اگزون III	۱۳۹
α_1 - R	5'-GGGTACGGGTGCAGGAAGG-3'	اگزون III	۱۳۹
α_2 - F	5'-ACGCCTCCCTGGACAAGTTC-3'	اگزون III	۱۳۸
α_2 - R	5'-AGGGCCCGGTGCAAGGAG-3'	اگزون III	۱۳۸
CLCN7- F	5'-CTCTTAGGCCAGGCGTTTGTG-3'	اینترون I	۱۲۸
CLCN7- R	5'-ACCGTGCTCAGCGCTATGC-3'	اینترون I	۱۲۸

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- انتخاب ناقلین و استخراج DNA ژنومی

تعداد ۶۰ فرد مشکوک به ناقل حذف آلفا-تالاسمی (MCH > ۲۷ پیکوگرم، MCV > ۸۰ فمتولیت، HbA2 طبیعی یا بیش از ۳/۵ درصد، HbF طبیعی یا بالا و رد فقر آهن) و همچنین ۱۵ ناقل قطعی آلفا-تالاسمی که به کلینیک ویژه تشخیص پیش از تولد انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر مراجعه کرده بودند بعد از تکمیل فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند. شاخص‌های خون‌شناسی افراد بررسی شده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. استخراج DNA از گلبول‌های سفید خون محیطی و با استفاده از روش نمک اشباع (Salting out) [۱۰] انجام و غلظت و کیفیت آن توسط اسپکتروفتومتر NanoDrop® ND-1000 در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. نمونه‌هایی که نسبت A260/A280 در آن‌ها بیش از ۱/۵ بود، برای آنالیز کمی انتخاب شدند.

۲-۲- Gap PCR چندگانه

روش Gap PCR چندگانه برای شناسایی حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی (α^- ، α^{+} ، α^{+} ، α^{+} ، α^{+}) با استفاده از آغازگرهای (Primers) مقاله تان (Tan) و همکارانش [۷] انجام پذیرفت. مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۳/۵ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۲۰۰ نانوگرم، ۰/۳ میکرولیتر از مخلوط آغازگرها، ۰/۳ واحد از آنزیم Taq پلیمرز و ۲۱ میکرولیتر بافر PCR تهیه شد. واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت، سپس برنامه تکثیر زیر برای ۳۵ چرخه انجام یافت: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. همچنین واکنش برای مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و در انتها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از اشعه ماورای بنفش مشاهده شد.

پس از محاسبه کارایی به‌منظور استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ، این بار روش Real-time PCR روی ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7 در مورد نمونه‌های مشکوک به حذف انجام شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس براساس آن C_T تعیین شد. در ادامه پس از تفاضل میانگین C_T ژن هدف برای هر دو نمونه طبیعی و آزمون از میانگین C_T ژن مرجع، شاخص ΔC_T در نمونه طبیعی و نمونه آزمون محاسبه و از تفاضل دو ΔC_T مربوط به نمونه طبیعی و نمونه آزمون، فاکتوری تحت عنوان $\Delta\Delta C_T$ مطابق فرمول زیر به‌دست آمد:

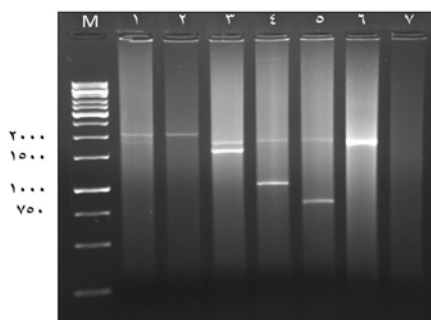
$$\Delta\Delta C_T = [mC_{T\alpha} (\text{نمونه نرمال}) - mC_{T\text{CLCN7}} (\text{نمونه نرمال})] - [mC_{T\alpha} (\text{نمونه آزمون}) - mC_{T\text{CLCN7}} (\text{نمونه آزمون})]$$

در نهایت تعداد نسخ ژن‌های هدف α_1 و α_2 گلوبین با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_T}$ مشخص شد [۱۱، ۱۲]. آنالیز داده‌های فوق با استفاده از نرم‌افزارهای SDS نسخه ۱/۲/۳ (Applied Biosystems, UK) Excel 2007 (Microsoft corp) و SPSS نسخه ۱۶ (Chicago, IL, USA) انجام پذیرفت.

۳- نتایج

۳-۱- Gap PCR چندگانه

روش Gap PCR چندگانه امکان شناسایی حذف‌های شناخته شده را به‌صورت همزمان و در یک واکنش فراهم می‌سازد. با استفاده از این روش وجود حذف‌های شناخته شده $\alpha^{-3.7}$ ، $\alpha^{-4.2}$ ، $\alpha^{-20.5}$ ، MED-، در ۲۰ فرد کنترل شناسایی شد (شکل ۱).



شکل ۱ شناسایی حذف‌های شناخته شده توسط Gap PCR چندگانه؛ ستون M: نشانگر ۱ کیلوبازی، ستون ۱: هتروزیگوت حذف ۳/۷ کیلوبازی (۲۰۲۲ و ۱۸۰۰ جفت‌بازی)، ستون ۲: هموزیگوت حذف ۳/۷ کیلوبازی (۲۰۲۲ جفت‌بازی)، ستون ۳: هتروزیگوت حذف ۴/۲ کیلوبازی (۱۶۲۸ و ۱۸۰۰ جفت‌بازی)، ستون ۴: هتروزیگوت حذف ۲۰/۵ کیلوبازی (۱۰۰۷ و ۱۸۰۰ جفت‌بازی)، ستون ۵: هتروزیگوت حذف Med (۸۰۷ و ۱۸۰۰ جفت‌بازی)، ستون ۶: نرمال (۱۸۰۰ جفت‌بازی)، ستون ۷: فاقد DNA الگو

۲-۳- مخلوط واکنش و برنامه Real-time PCR

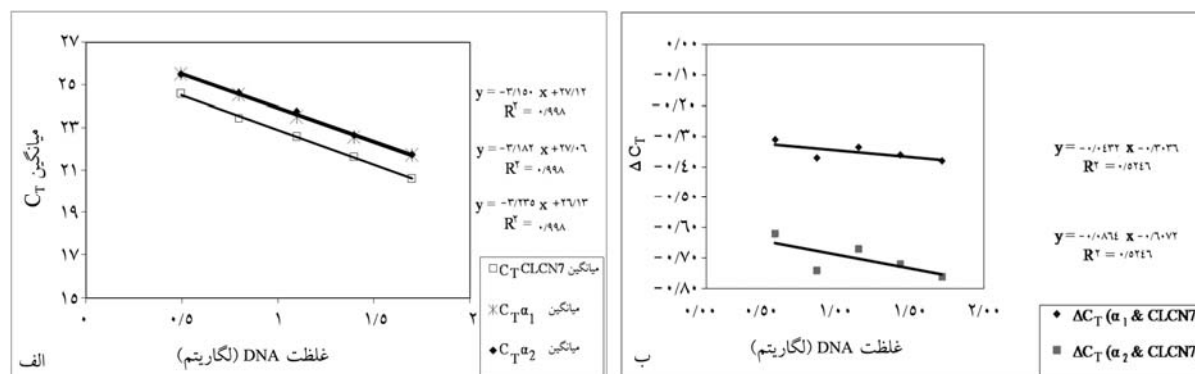
آغازگرهای الیگونوکلوئوتیدی برای ژن‌های α_1 ، α_2 و همچنین ژن CLCN7 به‌عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم‌افزار Primer Express نسخه ۳/۰ (Applied Biosystems, Foster City, CA) طراحی و توالی آن‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI/BLAST تأیید شد. توالی آغازگرهای به‌کار گرفته شده در این مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

برای هر واکنش مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, UK)، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۶/۵ میکرولیتر آب و ۵ نانوگرم DNA ژنومی تهیه شد. واکنش‌های هر نمونه DNA برای هر سه ژن، سه سری و به‌صورت همزمان انجام و میانگین C_T ‌های به‌دست آمده برای هر ژن محاسبه شد. برای انجام Real-time PCR در دستگاه ABI 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA) از برنامه زیر استفاده شد: مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت‌سازی اولیه DNA الگو در چرخه اول در مدت زمان ۱۰ دقیقه انجام و سپس دو برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه. هر مرحله تکثیری کامل، توسط یک مرحله تفکیک به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ ثانیه، ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ ثانیه به‌منظور آنالیز منحنی ذوب همراه شد.

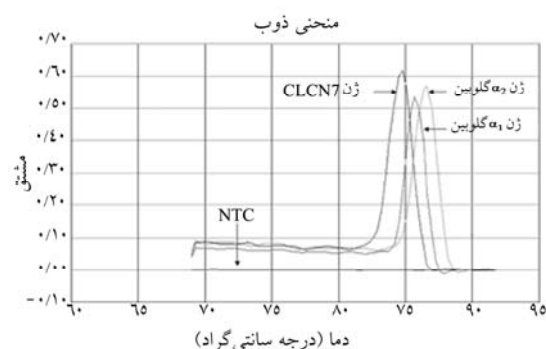
۲-۴- آنالیز اطلاعات با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$

در ابتدا به‌منظور تعیین کارایی تکثیر ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7، به‌صورت همزمان سری رقت از DNA طبیعی (از ۵۰ تا ۳/۱۳ نانوگرم در میکرولیتر) تهیه شد و پس از انجام Real-time PCR، نمودار استاندارد برای هر قطعه ژنی ترسیم شد. محاسبه کارایی PCR برای هر سه ژن با تعیین شیب (Slope) نمودار استاندارد و با استفاده از فرمول کارایی (Efficiency) محاسبه شد:

$$1 - [10^{(-1/\text{شیب})}] = \text{کارایی}$$



شکل ۲. مراحل بهینه‌سازی Real-time PCR: الف: منحنی استاندارد بر پایه سری رقت‌ها از DNA فرد نرمال برای ژن‌های α1 و α2 گلوبین و CLCN7 به منظور محاسبه کارایی، ب: ارزیابی همزمان شاخص‌های ΔCt برای α1/CLCN7 و α2/CLCN7 بر پایه غلظت‌های متوالی از DNA ژنومی؛ معادله خطوط به ترتیب $y = -0.081x - 0.107$ و $y = -0.132x - 0.333$ است. همگی خطوط دارای شیب کمتر از ۰/۱ هستند که یک شرط لازم در استفاده از روش Ct در سنجش‌های Real-time PCR محسوب می‌شود.



شکل ۳. آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های α1 و α2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7؛ هریک از قله‌ها نمایانگر دمای ذوب یک محصول PCR است.

۳-۳- شناسایی حذف‌های ژنی آلفا-گلوبین

توسط Real-time PCR

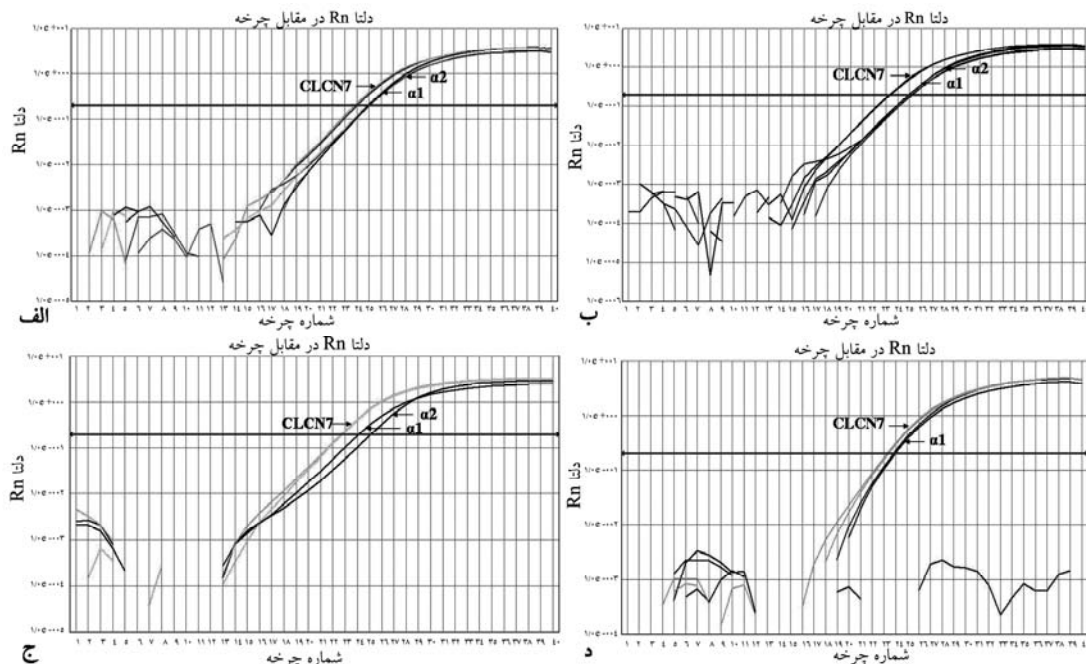
با انجام Real-time PCR برای ژن‌های α1 و α2 و CLCN7 در ۶۰ فرد مشکوک به حذف در ژن‌های آلفا-گلوبین که هیچ‌کدام از حذف‌های شناخته شده برای آن‌ها شناسایی نشده بود، وجود حذف در ۴۰ نفر بدون هیچ اطلاعی از سرحدات دقیق حذف شناسایی شد. از این تعداد ۱۰ فرد دارای حذف در ژن α1 و α2 به صورت همزمان، و ۲۵ فرد دارای حذف در ژن α2 به صورت هتروزیگوت و ۵ فرد دارای حذف در ژن α2 به صورت هموزیگوت هستند. همچنین وجود حذف در تمامی ۱۵ نمونه افراد کنترل حذف که وجود حذف شناخته شده در آن‌ها توسط Gap PCR چندگانه شناسایی شده بود، توسط Real-time PCR تأیید شد که نشانه دقت و حساسیت این روش کمی است.

همان‌گونه که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود منحنی‌های

۲-۳- کارایی تکثیر در Real-time PCR

رسم منحنی استاندارد بر پایه سری رقت‌ها از نمونه DNA نرمال برای ژن‌های α1 و α2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7. کارایی PCR را برای هر سه ژن تقریباً برابر دانست. شیب به دست آمده از منحنی‌های تکثیر ژن‌های α1 و α2 و CLCN7 به ترتیب -۳/۱۸، -۳/۱۵ و -۳/۲۳ و همچنین ضریب همبستگی (R^2) برای ژن‌های مذکور معادل ۰/۹۹ است که نشانه وجود هماهنگی بین تغییرات غلظت DNA و اختلاف Ct‌ها است (شکل ۲ الف).

همچنین سازگاری و هماهنگی تمامی واکنش‌های PCR به واسطه دامنه وسیعی از غلظت‌های DNA الگوی طبیعی (از ۵۰ تا ۳/۱۳ نانوگرم در میکرولیتر) با رسم نموداری بر مبنای شاخص‌های ΔCt ژن‌های آلفا-گلوبین و CLCN7 در مقابل لگاریتم غلظت DNA ارزیابی شد. شیب ≤ 0.1 این نمودار پس از تعدیل شدن ژن هدف توسط ژن مرجع CLCN7 نیز صحت ارزیابی نسبی و روش مقایسه‌ای Ct را می‌رساند (شکل ۲ ب). همچنین به واسطه تغییرات دمایی که در آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) صورت می‌پذیرد، هر قطعه DNA دو رشته‌ای موجود در محصول براساس طول و محتوای بازهای GC در دمای ذوب اختصاصی خود، تک رشته‌ای شده و این تغییر حالت توسط سیستم به صورت یک قله (Peak) نمایش داده می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، وجود تنها یک قله مرتبط با هر ژن، نشانه عدم وجود مواردی چون محصول غیراختصاصی و آغازگر دایمر است.

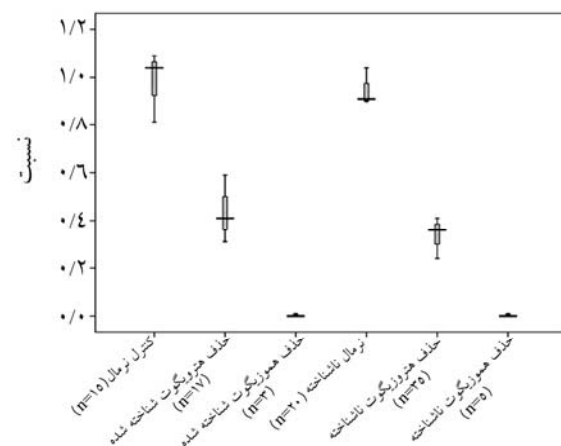


شکل ۴: منحنی تکثیر DNA برای ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین و ژن مرجع CLCN7. الف: منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد سالم؛ ژن‌های α_1 و α_2 در چرخه ۲۵ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۴ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده و به آستانه رسیده است. ب: منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل حذف در ژن‌های α_1 و α_2 ژن‌های α_1 و α_2 در چرخه ۲۵ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است. ج: منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل حذف در ژن α_2 ژن α_1 در چرخه ۲۴ و ژن α_2 در چرخه ۲۵ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است. د: منحنی تکثیر DNA مربوط به حذف هموزیگوت در ژن α_2 ژن α_1 در چرخه ۲۴ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است. واکنش تکثیر ژن α_2 در فرد هموزیگوت رخ نداده است.

۴- بحث

در مسیر غربالگری تالاسمی قبل از ازدواج و شناسایی جهش‌ها، تعداد زیادی از مراجعین به آزمایشگاه‌های ژنتیک، به صورت موارد مشکوک یا نامشخص باقی می‌مانند. این افراد دارای (Mean Corpuscular Volume) MCV و (Mean Cell Haemoglobin) (کمتر از ۸۰ و ۲۷) هستند. در اکثر موارد این افراد دارای سطح HbA2 طبیعی یا نزدیک آستانه هستند (۳/۵ درصد یا کمتر) که تعیین وضعیت این افراد از اهمیت زیادی برخوردار است. دلایل قرار گرفتن این افراد در گروه موارد مشکوک به چند دلیل است؛ ابتدا این‌که فرد ممکن است دارای جهش خفیف باشد که در دسته ناقلین خاموش طبقه‌بندی می‌شود. وقوع حذف در ژن بتا و دلتا-گلوبین یا جهش در ژن دلتا-گلوبین می‌توانند از عوامل دیگر ایجاد سطح HbA2 طبیعی باشند. علت دیگر را می‌توان به دلیل همزمانی وجود آلفا و بتا-تالاسمی در فرد دانست. همچنین وقوع حذف در خوشه ژنی بتا-گلوبین که ناحیه

مرتبط با تکثیر ژن‌های α_1 و α_2 در فرد ناقل حذف به علت فقدان یک نسخه از ژن هدف، یک چرخه دیرتر از منحنی متناظر در فرد سالم به آستانه رسیده‌اند. محاسبه نسبت $2^{-\Delta\Delta C_T}$ که در واقع میزان نسبی ژن را در نمونه ناشناخته نسبت به نمونه طبیعی تعیین می‌نماید، نسبت 0.90 ± 0.16 را برای افراد سالم و نسبت 0.32 ± 0.15 را برای افراد ناقل حذف هتروزیگوت در ژن‌های α_1 و α_2 گلوبین نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵: مقایسه نسبت‌های به دست آمده در گروه‌های مختلف

گاما-گلوبین را نیز درگیر کرده باشد یا حتی ارائه نتایج اشتباه در آزمایش‌های خون‌شناسی (Cell Blood Count: CBC) و تعیین دقیق سطح HbA2 با فقر آهن می‌توانند از دلایل دیگر قلمداد شوند [۱، ۱۳، ۱۴]. بنابراین می‌بایست با استفاده از روش‌های متعدد ناقل آلفا یا بتا-تالاسمی بودن افراد مشکوک را مشخص نمود. در صورتی که احتمال وجود حذف داده شود، باید با به‌کارگیری روش‌های نوین وجود حذف در ژن‌های آلفا یا بتا-گلوبین را مشخص و سپس با به‌کارگیری روش‌های مولکولی دامنه حذف را تشخیص داده و در ادامه برای آن‌ها روش‌های تشخیص سریع و دقیق راه‌اندازی نمود.

روش Real-time PCR در شناسایی بازآرایی‌های ژنی در مورد بیماری‌های متعددی همچون نشانگان ویلیام-برن (Williams-Beuren syndrome) [۱۵]، نشانگان آنجلمن (Angelman syndrome) [۱۶] و بیماری پلی‌زائوس-مرزباچر (Pelizaeus-Merzbacher) [۱۷] استفاده شده است. همچنین استفاده از این روش در مورد شناسایی تعدادی از حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی نیز گزارش شده است [۱۸] که البته روش Gap PCR چندگانه به‌عنوان روشی مناسب و سریع برای شناسایی حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی نیز قادر به شناسایی این دسته از حذف‌ها است. بدیهی است این روش توانایی شناسایی حذف‌هایی با دامنه نامشخص را ندارد. اخیراً روش کمی تکثیر وابسته به اتصال شناساگرهای چندگانه (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: MLPA) از کاربرد وسیعی در زمینه تشخیص حذف و مضاعف‌شدگی ژنی برخوردار شده است. در این روش توانایی تکثیر تعداد زیادی از جایگاه‌ها توسط یک جفت آغازگر وجود دارد [۱۹]. البته جداسازی محصولات تکثیر شده توسط الکتروفورز موئن توسط دستگاه توالی‌یابی و صرف زمان و هزینه زیاد و همچنین دقت کمتر نسبت به آنچه که در آنالیز Real-time PCR وجود دارد از نقاط ضعف روش MLPA محسوب می‌شود.

استفاده از رنگ‌های متصل‌شونده به DNA همچون سایبرگرین

I (SYBR Green I) در مطالعات میزان ژنی توسط Real-time PCR حساسیت بیشتری را نسبت به استفاده از شناساگرها در این روش ایجاد می‌کند. بدیهی است این ویژگی رنگ سایبرگرین I با اتصال مولکول‌های زیاد رنگ به DNA دو رشته فراهم می‌شود. همچنین استفاده از این رنگ‌ها از نظر اقتصادی نسبت به استفاده از شناساگرها در Real-time PCR مقرون به صرفه است و امکان تشخیص سریع همراه با حساسیت بالا در شناسایی حذف در خوشه ژنی آلفا-گلوبین را فراهم می‌آورند [۲۰].

آنچه در آنالیز Real-time PCR و استفاده از روش مقایسه‌ای C_T حائز اهمیت است این است که درستی و دقت تعیین تعداد نسخه‌های ژنی با میزان کارایی تکثیر ژن‌های هدف و ژن مرجع دارای ارتباط مستقیم است. بنابراین شیب منحنی استاندارد رسم شده برای هر ژن و ضریب همبستگی (R^2) خط رسم شده براساس رقت‌های متوالی DNA، باید در محدوده قابل پذیرش (شیب بین $3/1$ تا $3/6$ و $R^2 > 0/95$) بوده و در ژن‌های مورد بررسی تا حد امکان یکسان باشند [۱۲، ۲۱].

در تحقیق حاضر تمامی موارد ناقل قطعی که وجود حذف شناخته شده در آن‌ها توسط Gap PCR چندگانه شناسایی شده بود، با روش Real-time PCR به‌درستی تشخیص داده شدند که این می‌تواند تأییدی بر صحت نتایج حاصل شده برای موارد ناشناخته باشد. مطالعه حاضر نشان داد که این روش می‌تواند برای تعیین وضعیت نهایی موارد مشکوک به حذف آلفا-تالاسمی کاملاً کارساز باشد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به کلیه بیماران و خانواده‌های محترم آن‌ها و نیز تمامی همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر اعلام می‌دارند. این طرح با پشتیبانی مالی انستیتو پاستور ایران (طرح شماره ۴۴۱) و نیز صندوق حمایت از پژوهشگران انجام شد.

۶- منابع

- [1] Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford, Malden, MA: Blackwell Science, 2001; p:484-525.
- [2] Abolghasemi H, Amid A, Zeinali S, Radfar MH, Eshghi P, Rahiminejad MS, Ehsani MA, Najmabadi H, Akbari MT, Afrasiabi A, Akhavan-Niaki H, Hoorfar H. Thalassemia in Iran: epidemiology, prevention, and management. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29(4): 233-8.
- [3] Samavat A, Modell B. Iranian national thalassaemia screening programme. *BMJ* 2004; 329(7475): 1134-7.
- [4] Hartevelde CL, Yavarian M, Zorai A, Quakkelaar ED, van Delft P, Giordano PC. Molecular spectrum of alpha-thalassemia in the Iranian population of Hormozgan: three novel point mutation defects. *Am J Hematol* 2003; 74(2): 99-103.
- [5] Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol* 2004; 26(3): 159-76.
- [6] Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev* 2003; 17(1): 43-53.
- [7] Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001; 98(1): 250-1.
- [8] Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Barros F. Duplication and deletion analysis by fluorescent real-time PCR-based genotyping. *Clin Chim Acta* 2006; 363(1-2): 138-46.
- [9] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.
- [10] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- [12] Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18(2): 212-4.
- [13] Eram SM, Azimifar B, Abolghasemi H, Foulady P, Lotfi V, Masrouri M, Hosseini M, Abdolhosseini A, Zeinali S. The IVS-II-1 (G-->a) beta0-thalassemia mutation in cis with HbA2-Troodos [delta116(G18)Arg-->Cys (CGC-->TGC)] causes a complex prenatal diagnosis in an Iranian family. *Hemoglobin* 2005; 29(4): 289-92.
- [14] Zeinali S, Mohammad Eram S, Azimifar SB, Lotfi V, Foulady P, Masrouri M. First report on the co-inheritance of (beta) IVS I-1 (G-->T) Thalassemia with the (gamma) CD85 [Phe-->Ser (F1) (TTT-->TCT)] HbA2 Etolia in Iran. *Haematologica* 2006; 91(6 Suppl): ECR15.
- [15] Schubert C, Laccone F. Williams-Beuren syndrome: determination of deletion size using quantitative real-time PCR. *Int J Mol Med* 2006; 18(5): 799-806.
- [16] Raca G, Buiting K, Das S. Deletion analysis of the imprinting center region in patients with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome

- by real-time quantitative PCR. *Genet Test* 2004; 8(4): 387-94.
- [17] Mikesová E, Baránková L, Sakmaryová I, Tatarková I, Seeman P. Quantitative multiplex real-time PCR for detection of PLP1 gene duplications in Pelizaeus-Merzbacher patients. *Genet Test* 2006; 10(3): 215-20.
- [18] Liu J, Yan M, Wang Z, Wang L, Zhou Y, Xiao B. Molecular diagnosis of alpha-thalassemia by combining real-time PCR with SYBR Green1 and dissociation curve analysis. *Transl Res* 2006; 148(1): 6-12.
- [19] Hartevelde CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, Giordano PC. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet* 2005; 42(12): 922-31.
- [20] Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* 2003; 3: 18.
- [21] Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 85.

بررسی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در پلاسمودیم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در دو سال متوالی در شهرستان چابهار

عبدالحسین دلیمی^۱، فاطمه جالوسیان^{۲*}، سیامک میراب‌سمیعی^۳، فاطمه غفاری‌فر^۴، فرامرز سلیمانلو^۵، رامین نقی‌زاده^۶

۱- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، آزمایشگاه کنترل غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- استادیار، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، کلینیک تخصصی دی، تهران، ایران

۶- کارشناس ارشد، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، کلینیک تخصصی دی، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۵

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۲۰

چکیده

هدف: مقاومت دارویی پلاسمودیم فالسی‌پاروم نسبت به کلروکین مشکل اصلی در مناطق مالاریا خیز است. وجود ارتباط بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های *pfprt* و *pfmdr1* پلاسمودیم فالسی‌پاروم با مقاومت نسبت به کلروکین شناخته شده است. در این مطالعه پنج چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ژن *pfmdr1* و یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ژن *pfprt* با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور ۲۶ نمونه خون از افراد آلوده به پلاسمودیم فالسی‌پاروم و مقاوم به کلروکین از بندر چابهار در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. این جهش‌ها با استفاده از روش Light Cycler™ و پروب‌های دوره‌سازی شناسایی شدند.

نتایج: طبق نتایج این مطالعه در کدون ۸۶ ژن *pfmdr1* تعداد ۶ نمونه (۲۳ درصد) از مجموع ۲۶ نمونه مورد مطالعه جهش مشاهده شد. گرچه این جهش در سال اول مطالعه، دیده نشد ولی در سال دوم قابل ملاحظه بود. جهش K76T ژن *pfprt* در کدون CVMNT ژن *pfprt* در (۴۲/۳ درصد) ۱۱ نمونه‌ها و در کدون‌های CVIET در (۲۷/۹ درصد) ۷ نمونه‌ها، SVIET تنها در دو نمونه (۷/۶ درصد) و SVMNT در ۵ نمونه (۱۹/۲ درصد) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: جهش در طول دو سال مطالعه افزایش یافته است. نتایج مطالعه نشان داد که چندشکلی نوکلئوتیدی مربوط به ژن‌های *pfprt* و *pfmdr1* در منطقه وجود دارد که این موضوع می‌تواند به‌عنوان نشانگری برای کنترل مالاریا در چابهار مدنظر باشد.

کلیدواژگان: پلاسمودیم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین، ایران، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، *pfprt*، *pfmdr1*

۱- مقدمه

کشور ماست. این بیماری به علت ایجاد کم‌خونی و ضعف و ناتوانی باعث اتلاف نیروی کار شده و بر وضعیت اقتصادی و

مالاریا (Malaria) یک بیماری انگلی و یکی از مسائل مهم بهداشتی تعدادی از کشورهای مناطق گرمسیری دنیا و از جمله

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۴۱۱۵

Email: Jalousian_f@yahoo.com

کشاورزی این کشورها اثر می‌گذارد [۱]. در کشور ما این بیماری در مناطق جنوبی و جنوب شرقی دیده می‌شود. شهرستان چابهار در منتهی‌الیه جنوب شرقی استان سیستان و بلوچستان در کنار آب‌های گرم دریای عمان واقع شده و مرکز آن شهر چابهار است. در این شهر علاوه شیوع این بیماری، مقاومت دارویی پلاسمودیوم فالسی‌پاروم (*Plasmodium falciparum*) نسبت به کلروکین (Chloroquin) گزارش شده است. مقاومت دارویی در پلاسمودیوم فالسی‌پاروم به معنی توانایی سویه انگل در زنده ماندن و تکثیر در حضور غلظت‌هایی از داروست که به‌طور معمول انگل‌های همان نوع پلاسمودیوم را از بین برده یا از تکثیر آن‌ها جلوگیری می‌کند [۲].

از سال ۱۳۶۲ بررسی حساسیت پلاسمودیوم فالسی‌پاروم در شرایط دریدن (*in vivo*) و آزمایشگاهی (*in vitro*) نسبت به تعدادی از داروهای ضد مالاریا به‌خصوص کلروکین در ایستگاه‌های تحقیقاتی بندرعباس و ایرانشهر توسط دکتر ادریسیان (Edrisian) و همکاران آغاز شد [۲]. این تحقیقات در ایران وجود مقاومت نسبت به کلروکین را اثبات نمودند. طی بررسی‌های ادریسیان و همکاران که به‌ترتیب در سال‌های ۹۳-۱۹۹۰ و سپس ۹۶-۱۹۹۴ در هر سه استان هرمزگان، سیستان و بلوچستان و کرمان انجام گرفت به‌ترتیب ۷۳/۴ درصد و ۶۰/۲ درصد موارد نسبت به کلروکین مقاوم بودند [۳].

تحقیقات محققان در کشورهای مالایاخیز نشان داد که جهش‌های ژن *pfmdr1* تا حدی باعث مقاومت به کلروکین می‌شود [۴]. اما بروز آرام مقاومت به کلروکین در مقایسه با ظهور سریع مقاومت انتخابی به داروهای آنتی‌فولات دخالت یک مکانیسم وابسته به چند ژن (Multigenic) را نشان می‌دهد. نتایج مطالعات برخی از محققان نیز همراهی دو ژن *pfmdr1* و *pfcr1* به‌جای یک ژن مرتبط با مقاومت انگل را نشان می‌دهد [۵]. یکی از اهداف تعیین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphisms: SNPs) تعیین منشأ بیماری‌ها و نقشه گسترش بیماری‌های واگیر است تا جهش‌های جدید را ردیابی و تشخیص نمایند این جهش‌ها ممکن است مقاومت به داروها را ایجاد کنند به‌همین دلیل

مطالعه بر ژنوتیپ SNPs اطلاعات بسیار با ارزشی برای کنترل دقیق درمان بیماری‌ها ارائه می‌دهد. تشخیص بیماری‌ها با استفاده از روش‌های تشخیصی دقیق همواره مورد توجه محققان بوده است، توانایی تشخیص جهش‌ها یا الگوی آن‌ها به محققین اجازه می‌دهد که ارتباط عوامل بیماری‌ها را با مقاومت دارویی پیدا کنند. دقت مهم‌ترین ویژگی است که اغلب محققین برای تعیین ژنوتیپ SNPs در نظر می‌گیرند [۵]. در این مطالعه از پروب‌های دورگه‌سازی (Hybridization probes) استفاده شد که به‌طور اختصاصی و دقیق SNPs را تشخیص می‌دهند. پروب‌های دورگه‌سازی شامل نوکلئوتیدهای متفاوت هستند که به توالی داخلی تکثیر شده توسط آغازگرهای (Primers) رفت و برگشت باند می‌شوند [۵]. سیستم‌های Real-time PCR به تعیین و اندازه‌گیری آشکارگر فلورسنتی وابسته است که علائم (Signals) این آشکارگر فلورسنتی نسبت مستقیمی با مقدار محصول PCR در واکنش دارد. در نتیجه این روش یک سیستم قوی برای تعیین ژنوتیپ SNPs به‌شمار می‌آید. با توجه به این‌که برای تعیین جهش‌های احتمالی در ژن‌های پلاسمودیوم فالسی‌پاروم تاکنون در ایران فقط مطالعه معدودی صورت گرفته است [۶، ۷] و در هیچ‌کدام از این مطالعات از روش Real-time PCR برای این منظور استفاده نشده است، بنابراین هدف این تحقیق بررسی و تشخیص جهش‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های *pfmdr1* و *pfcr1* پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین با استفاده از روش Real-time PCR بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

۲۶ نمونه خون افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم در شهرستان چابهار که آلودگی آن‌ها با گسترش نازک و ضخیم لام خون محیطی تأیید شده بود، جمع‌آوری شد. تمام این نمونه‌ها از بیمارانی که به درمان دارویی کلروکین طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) پاسخ

منفی داده بودند تهیه شد.

تعداد ۷ نمونه در سال اول و ۱۹ نمونه در سال دوم تحقیق جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها در شهرستان چابهار جمع‌آوری شد و سپس به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام نمونه‌ها از افراد ایرانی آلوده ساکن چابهار جمع‌آوری شد. DNA این نمونه‌ها با استفاده از کیت QIAamp DNA minikit (QIAGEN) استخراج شد.

۲-۲- سویه‌های مرجع پلاسمودیم فالسی پاروم

سه سویه پلاسمودیم فالسی پاروم که حساسیت و مقاومت آن‌ها به کلروکین تعیین شده بود به‌عنوان مرجع انتخاب شدند. سویه 3D7، حساس به کلروکین است (از هلند است) و سویه‌های W2 و 7G8 مقاوم به کلروکین هستند (سویه W2 از جنوب شرق آسیا و 7G8 از برزیل است). این سویه‌ها از محیط کشت برداشته و به‌صورت نقطه‌گذاری شده روی کاغذ واتمن توسط دی‌مونبریسون (de Monbrison) از فرانسه ارسال شدند.

۲-۳- تعیین جهش‌های *pfmdr1*

تشخیص جهش‌ها با استفاده از Light cycler و پروب‌های دوره‌سازی انجام شد.

برای جهش‌های *pfmdr1* پروب‌های دوره‌سازی شامل دو الیگونوکلوئید متفاوت بودند که به توالی داخلی تکثیر شده توسط آغازگرهای رفت و برگشت متصل می‌شوند.

پروپ حس‌گر (Sensor probe)، در انتهای 3' با فلورسئین نشاندار شده است و برای تشخیص ناحیه دارای جهش طراحی شده است. پروپ آنکور (Anchor probe)، در انتهای 5' با Light Cycler Red 640 نشاندار شده است و در انتهای 3' فسفوریله شده است تا از طول شدن توسط آنزیم تک‌پلیمرز جلوگیری شود، این پروب برای اتصال به ناحیه مجاور با ناحیه دارای جهش‌یافته طراحی شده است. هر دو پروب روی یک رشته DNA متصل می‌شوند و دو تا رنگ فلورسنت در مجاورت همدیگر قرار

می‌گیرند و پدیده انتقال انرژی رزونانس فلورسنت (Florescence Resonance Energy Transfer: FRET) بین آن‌ها رخ می‌دهد [5].

برای کدون ۸۶ و ۱۸۴، برنامه PCR به این شرح بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹ دقیقه و ۳۵ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه و با برنامه ذوب ۳۵-۷۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت تغییر دما (Temperature Transition Rate: TTR) ۰/۲ درجه در ثانیه ادامه یافت.

برای کدون ۱۰۳۴ و ۱۰۴۲ و ۱۲۴۶ شرایط به این صورت بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹ دقیقه و ۴۰ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و ۵۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۵ ثانیه و با برنامه ذوب ۳۵-۸۰ درجه سانتی‌گراد و TTR ۰/۲ درجه در ثانیه ادامه یافت.

۲-۴- تعیین جهش‌های *Pfcr*

برای تعیین جهش‌های ژن *pfcr* آغازگر پایین‌دست در انتهای 3' با Light Cycler red 640 نشاندار شده که به‌عنوان پروب آنکور است، طی مراحل تکثیر، این آغازگر (که آغازگر برگشت است) طولی می‌شود و پدیده FRET بین پروب حس‌گر و محصول PCR که به‌عنوان پروب آنکور است رخ می‌دهد [5].

پس دمای ذوب اختصاصی هر ژنوتیپ تعیین شد: پروب حس‌گر حتی با وجود عدم تطابق یک نوکلئوتید هم می‌تواند به توالی هدف متصل شود اما نسبت به پروب حس‌گری که کاملاً تطابق دارد در دمای پایین‌تری جدا می‌شود [5].

برای کدون‌های مختلف *Pfcr* پس از مرحله اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، با ۴۰ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه با برنامه ذوب ۳۲-۷۲ درجه سانتی‌گراد و TTR ۰/۲ درجه در ثانیه ادامه یافت.

در هر بار آزمایش (run) هر سه نمونه مرجع و کنترل‌های

هاپلوتیپ CVMK مشاهده نشد. نسبت این جهش در سال اول مطالعه به مراتب کمتر از سال دوم بوده است.

جدول ۲ فراوانی جهش K76T ژن *pfcr* در میان ۲۶ نمونه خون افراد آلوده به پلاسمودیم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در چابهار

نمونه‌ها	کدون‌ها				
	CVMK*	SVMNT	SVIET	CVMNT	CVIET
	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)
	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد
کل نمونه‌ها (تعداد=۲۶)	۷ (۲۶/۹)	۱۱ (۴۲/۳)	۲ (۷/۶)	۵ (۱۹/۲)	۱ (۳/۸)
سال اول نمونه‌گیری (تعداد=۷)	۱ (۱۴/۳)	۵ (۷۱/۴)	۰ (۰)	۱ (۱۴/۳)	۰ (۰)
سال دوم نمونه‌گیری (تعداد=۱۹)	۶ (۳۱/۶)	۶ (۳۱/۶)	۲ (۱۰/۵)	۴ (۲۱)	۱ (۵/۲)

* در این کدون جهش K76T مشاهده نشد.

منحنی‌های تجزیه و تحلیل دمای ذوب نمونه‌های خون آلوده به پلاسمودیم فالسی‌پاروم و سویه‌های مرجع برای تشخیص جهش K76T ژن *pfcr* در شکل ۱ آمده است. منحنی پنج نمونه با منحنی سویه استاندارد 7G8 (سویه مقاوم) که حاوی جهش K76T است کاملاً مطابقت دارد بدین معنی که دمای ذوب آن‌ها 43.7 ± 0.2 بوده است که متفاوت با دمای ذوب سویه حساس D73 است.

۴- بحث

با تجزیه و تحلیل منحنی دمای ذوب در روش Real-time PCR می‌توان به‌طور بالقوه به روشی قوی و کاربردی برای تشخیص SNPs در دو ژن *Pfcr* و *pfmdr1* پلاسمودیم فالسی‌پاروم دست یافت. این روش در یک سیستم کاملاً بسته انجام شده و نمونه‌ها بدون آلودگی قابل استفاده برای انجام روش‌های دیگر هستند. در این روش برای خواندن نتایج به الکتروفورز پس از PCR نیازی نیست بنابراین نتایج سریع‌تر خوانده می‌شود و خطر آلودگی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) نیز وجود ندارد. علاوه بر این با وجود این روش نیازی به تعیین توالی نیست. امروزه برای

منفی (کنترل منفی دارای DNA انسانی به‌عنوان الگو و کنترل منفی فاقد DNA الگو (No Template Control: NTC)) در کنار سایر نمونه‌ها قرار داده شد. به‌منظور بررسی قابلیت تکرارپذیری روش، سویه‌های مرجع و نمونه‌ها هر کدام چهار بار با Light Cycler آزمایش و دمای ذوب آن‌ها تعیین شد. نتایج به‌صورت میانگین دمای ذوب $\pm$ دو برابر انحراف معیار (2SD) نشان داده شد.

۳- نتایج

پروب‌های دورگه‌سازی و تکنولوژی Light Cycler برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های *pfmdr1* و *pfcr* در مقایسه با سه سویه مرجع ارزیابی شدند. DNA این سویه‌ها با آغازگرهای اختصاصی برای ژن *pfmdr1* و *pfcr* تکثیر شدند و تجزیه و تحلیل منحنی دمای ذوب هم انجام شد. طبق نتایج جدول ۱، در کدون ۸۶ تعداد ۶ نمونه (۲۳ درصد) از مجموع ۲۶ نمونه مورد مطالعه جهش مشاهده شد. گرچه این جهش در سال اول مطالعه، دیده نشد ولی در سال دوم قابل ملاحظه بود.

جدول ۱ فراوانی جهش‌های *pfmdr1* در میان ۲۶ نمونه خون افراد آلوده به پلاسمودیم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در چابهار

نمونه‌ها	کدون‌ها			
	۸۶			
	جهش یافته	جهش نیافته	جهش یافته	جهش نیافته
کل نمونه‌ها (تعداد=۲۶)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)
	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد
سال اول نمونه‌گیری (تعداد=۷)	۰ (۰)	۷ (۱۰۰)	۰ (۰)	۷ (۱۰۰)
سال دوم نمونه‌گیری (تعداد=۱۹)	۶ (۳۱/۵)	۱۳ (۶۸/۵)	۰ (۰)	۱۹ (۱۰۰)

طبق نتایج جدول ۲، جهش K76T در هاپلوتیپ CVMNT ژن *pfcr* در (۴۲/۳ درصد) ۱۱ نمونه و هاپلوتیپ‌های CVIET ۷ (۲۶/۹ درصد) نمونه، و SVMNT در ۵ نمونه (۱۹/۲ درصد) مشاهده شد. این جهش تنها در یک نمونه (۳/۸ درصد) در

نمونه SVIET نشان دادند. از ۲۶ نمونه مورد آزمایش فقط یکی از نمونه‌ها جهش ۷۶ را نداشت با این حال این نمونه در ژن *pfmdrl* جهش N86Y را نشان داد.

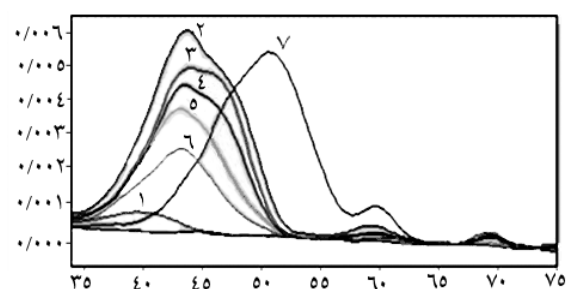
در هر دو سال در هیچ کدام از نمونه‌ها در جایگاه اسیدهای آمینه ۱۸۴، ۱۰۳۴، ۱۰۴۲ و ۱۲۴۶ ژن *pfmdrl* جهشی مشاهده نشد. در مطالعه یورسین (Ursin) و همکاران (۲۰۰۶) نیز که با استفاده از روش PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment length polymorphism) در منطقه چابهار انجام شده بود، جهشی در جایگاه‌های اسیدهای آمینه کدون‌های ۱۸۴، ۱۰۳۴، ۱۰۴۲ و ۱۲۴۶ یافت نشد. در مطالعه یورسین و همکاران (۲۰۰۶) حذف اسید آمینه جایگاه ۷۵ گزارش شده و همچنین ال‌های جهش یافته جایگاه‌های ۷۴، ۷۵ و ۷۶ توأمآ گزارش نشده است [۶]. در مطالعه اسماعیلی (Esmaili) و همکاران (۲۰۰۷) که در منطقه سرباز استان سیستان و بلوچستان انجام شده و از روش Nested-PCR استفاده نموده است جهش K76T را در ژن *pfprt* به میزان بسیار بالا (۹۳/۷۵ درصد) گزارش نموده است [۷].

در سایر مطالعاتی که در دیگر نقاط دنیا بر موارد مقاوم به کلروکین انجام شده دو هاپلوتیپ CVIET و SVMNT در ژن *pfprt* با مقاومت به ۴ آمینوکیلین‌ها مرتبط شمرده شده است [۹]. هاپلوتیپ‌های ژن *pfprt* در چابهار، جنوب شرقی ایران، مشابه هاپلوتیپ‌های CVIET در جنوب شرق آسیا و SVMNT در هند است، که تأییدی بر نظریه گسترش جهانی پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین است.

در این مطالعه جهش K76T در ژن *pfprt* بیشترین فراوانی را داشت در مطالعاتی که روی چندشکلی‌های ژنی انجام می‌شود، جهش K76T در ژن *pfprt* به عنوان نشانگر (Marker) تشخیصی برای مقاومت به کلروکین مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰]. مطالعاتی که روی ایزوله‌های آفریقا و آسیا و جنوب آمریکا انجام شده نشان می‌دهد که جهش T76 تقریباً در تمام نمونه‌های مقاوم به کلروکین وجود دارد [۱۱-۱۳]. مطالعاتی که در هند انجام شده نشان می‌دهد که جهش T76 شیوع بالایی در میان ایزوله‌های بالینی (۹۱ درصد) دارد و تقریباً در تمام نمونه‌هایی که به کلروکین پاسخ نمی‌دهد

تعیین جهش‌های تک نوکلئوتیدی Real-time PCR روش انتخابی محسوب می‌شود [۵].

اغلب مطالعات مولکولی پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین روی چندشکلی‌های موجود در دو ژن *pfprt* و *pfmdrl* متمرکز است. ژن *pfprt* روی کروموزوم ۷ قرار دارد و پروتئین‌های انتقالی غشای واکوئل را کد می‌کند. ژن *pfmdrl* روی کروموزوم ۵ قرار دارد و p گلیکوپروتئین هومولوگ ۱ (P-Glycoprotein Homologue 1: PGH1) را کد می‌کند [۵].



شکل ۱ منحنی‌های تجزیه و تحلیل دمای ذوب نمونه‌های خون آلوده به پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین در چابهار و سویه‌های مرجع برای تشخیص جهش K76T ژن *pfprt*. به ترتیب: از چپ به راست: ۱- منحنی 3D7 (سویه حساس)، ۲-۶ منحنی 7G8 (سویه مقاوم) و پنج نمونه حاوی جهش K76T و ۷- منحنی W2 (سویه مقاوم)

در ۷ نمونه مقاومی که در سال اول جمع‌آوری شده بودند در هیچ کدام از ۵ کدون ژن *Pfmdrl* جهشی مشاهده نشد که این تأییدی است بر مطالعات قبلی که ثابت می‌کند که مقاومت به کلروکین یک پدیده مولتی ژنتیک است و انجام مطالعه همزمان بر دو ژن *pfprt* و *pfmdrl* نتایج بهتری ارائه می‌دهد [۸]؛ از طرفی در این ۷ نمونه، جهش‌های تک نوکلئوتیدی در ژن *pfprt* مشاهده شد. بدین ترتیب که در ۵ (۷۱/۴ درصد) نمونه جهش در هاپلوتیپ SVMNT، یک نمونه (۱۴/۳ درصد) در هاپلوتیپ CVIET و یک نمونه (۱۴/۳ درصد) در SVMNT دیده شد.

در ۱۹ نمونه مقاومی که در سال دوم جمع‌آوری شده بود، ۶ (۳۱/۵ درصد) نمونه جهش N86Y را در ژن *pfmdrl* نشان دادند و در ژن *pfprt* ۶ (۳۱/۶ درصد) نمونه در هاپلوتیپ SVMNT، ۶ (۳۱/۶ درصد) نمونه در هاپلوتیپ CVIET و ۴ (۲۱ درصد) نمونه در هاپلوتیپ SVMNT و ۲ (۱۰/۵ درصد)

وجود دارد [۱۳]. به نظر می‌رسد که چندشکلی‌های ژن *pfcr* ایران و هند با توجه به تشابهی که دارند منشأ یکسانی دارند. نکته قابل توجه این است که در کشورهایی که داروی کلروکین را از برنامه درمانی ضد مالاریا حذف کرده‌اند شیوع جهش K76T نیز در آن کشور کاهش یافته است [۱۴].

از طرفی مطالعاتی که روی SNPs ژن *pfmdr1* انجام شده، نقش مهم جهش N86Y را در مقاومت به کلروکین نشان داده است. در نمونه‌های مقاوم به کلروکین ایزوله‌های پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مالزی، اندونزی، گینه، نیجریه و جنوب صحرای آفریقا جهش N86Y و شیوع بالای این جهش در ایزوله‌های کامبوج نیز گزارش شده است [۱۵]. اما مطالعاتی که در اوگاندا، لائوس، کامرون، جنوب آفریقا، برزیل و آمازون انجام شده نشان داد که وجود این جهش به تنهایی برای مقاوم شدن به کلروکین کافی نیست [۹، ۱۶-۲۰]. بنابراین مطالعه همزمان جهش‌های دو ژن *pfmdr1* و *pfcr* نتایج بهتری ارائه می‌دهد. مطالعات دیگری نشان داده است که جهش N86Y باعث افزایش حساسیت به مفلوکین (Mefloquine) و آرتیمیسینین (Artemisinin) می‌شود و این مطلب باید در درمان دارویی در مناطق بومی در نظر گرفته شود [۲۱].

به‌طور کلی در کشورهای مختلف این جهش‌ها براساس شیوع‌شان و ارتباطشان با مقاومت دارویی می‌توانند به‌عنوان شاخص‌های افتراقی برای تشخیص موارد مقاوم از موارد حساس به کلروکین به‌کار روند. هدف مطالعه حاضر معرفی روشی قوی و کاربردی برای تشخیص این جهش‌ها بود. روش Real-time PCR با استفاده از پروب‌های دورگه‌سازی می‌تواند به‌راحتی برای تعداد زیادی نمونه و به‌طور اختصاصی برای مطالعات مقاومت دارویی در سطح وسیع به‌کار گرفته شود. با توجه به وجود پتانسیل و امکانات انجام این آزمایش در ایران، پایش درمان و تشخیص زودرس مقاومت به داروهای مختلف به‌راحتی قابل انجام است.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دکتر مونبریسون بابت اهدای سویه‌های مرجع پلاسمودیوم فالسی‌پاروم از فرانسه و از مرکز تحقیقات دانشگاه تربیت مدرس در چابهار بابت همکاری در جمع‌آوری نمونه خون‌های آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین اعلام می‌دارند.

۶- منابع

- [1] Azizi F. Epidemiology and control of common diseases in Iran. 1st ed 2001. Tehran Eshtiagh publisher. (Persian)
- [2] Edrissian GH. Anti malaria drugs, malaria treatment and drug prophylaxis and Plasmodium falciparum drug resistance in malaria endemic areas in south and southeast Iran. Drug Treat 1989; 3: 11-20. (Persian)
- [3] Edrisian GH, Nateghpoor M, Afshar A, Sayedzadeh A, Mohsseni GH, Satvat MT, Emadi AM. Monitoring the response of Plasmodium falciparum and P. vivax to antimalarial drugs in the malarious areas in South-east Iran. Arch Im Med 1999; 2(2): 61-6.
- [4] Volkman SK, Hartl DL, Wirth DF, Nielsen KM, Choi M, Batalov S, Zhou Y, Plouffe D, Le Roch KG, Abagyan R, Winzeler EA. Excess polymorphisms in genes for membrane proteins in Plasmodium falciparum. Science 2002; 298(5591): 216-8.
- [5] de Monbrison F, Raynaud D, Latour-Fondanaiche C, Staal A, Favre S, Kaiser K, Peyron F, Picot S. Real-time PCR for chloroquine sensitivity assay and for pfmdr1-

- pfprt single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *J Microbiol Methods* 2003; 54(3): 391-401.
- [6] Ursing J, Zakeri S, Gil JP, Björkman A. Quinoline resistance associated polymorphisms in the pfprt, pfmdr1 and pfmrp genes of *Plasmodium falciparum* in Iran. *Acta Trop* 2006; 97(3): 352-6.
- [7] Esmaeili Rastaghi A, Nateghpoor M, Assmar M, Razavi MR, Kanbara HK, Uemura H, Naddaf SR, Keshavarz HK, Raeisi A, Mohebbali M. Detection of K76T mutation in pfprt gene as an applicable genetic marker for prediction of chloroquine resistant falciparum malaria in isolates from an endemic district of Iran. *Ir J Parasitol* 2008; 3 (2):48-56.
- [8] Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, Cowman AF. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1990; 345(6272): 255-8.
- [9] Schneider AG, Premji Z, Felger I, Smith T, Abdulla S, Beck HP, Mshinda H. A point mutation in codon 76 of pfprt of *P. falciparum* is positively selected for by chloroquine treatment in Tanzania. *Infect Genet Evol* 2002; 1(3): 183-9.
- [10] Mayor AG, Gómez-Olivé X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M, Barreto A, Alonso PL. Prevalence of the k76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfprt) gene and its relation chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis* 2001; 183(9): 1413-6.
- [11] Vinyak S, Biswas S, Dev V, Kumar A, Ansari MA, Sharama YD. Prevalence of the K76T mutation in the pfprt gene of *Plasmodium falciparum* among chloroquin responders in India. *Acta Trop* 2003; 87:287-93.
- [12] Berry A, Vessière A, Fabre R, Benoit-Vical F, Marchou B, Massip P, Magnaval JF. Pfprt K76T mutation and its associations in imported *Plasmodium falciparum* malaria cases. *Infect Genet Evol* 2004; 4(4): 361-4.
- [13] Durrand V, Berry A, Sem R, Glaziou P, Beaudou J, Fandeur T. Variations in the sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfprt) and their relationship to chloroquine resistance in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 136(2): 273-85.
- [14] Sharma YD. Genetic alteration in drug resistance markers of *Plasmodium falciparum*. *Indian J Med Res* 2005; 121: 13-22.
- [15] Khim N, Bouchier C, Ekala MT, Incardona S, Lim P, Legrand E, Jambou R, Doung S, Puijalón OM, Fandeur T. Countrywide survey shows very high prevalence of *Plasmodium falciparum* multilocus resistance genotypes in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3147-52.
- [16] Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Sci U S A* 1991; 88(8): 3382-6.
- [17] Pillai DR, Labbé AC, Vanisaveth V, Hongvongthong B, Pomphida S, Inkathone S, Zhong K, Kain KC. *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment

- outcome and predictive value of molecular markers. *J Infect Dis* 2001; 183(5): 789–95.
- [18] Warhurst D. New developments: chloroquine-resistance in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat* 2001; 4(3): 141–4.
- [19] Vieira PP, das Gracas Alecrim M, da Silva LH, González-Jiménez I, Zalis MG. Analysis of the Pfcrt K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of Brazil. *J Infect Dis* 2001; 183(12): 1832–3.
- [20] Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(4): 209–18.
- [21] Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene (pfcrt) and the multidrug resistance Gene pfmdr1. *J Infect Dis* 2001; 183(10):1535–8.

مهار ژن cAMP response element binding protein توسط siRNA در رده سلولی K562

زهرا دیلمی خیابانی^{۱*}، مهدی بنان^۲، علی محمد اصغریان^۳، جلال قره‌سوران^۴، حسین نجم‌آبادی^۵

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، مازندران، ایران

۴- مربی، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۵- استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۲۷

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۲۸

چکیده

هدف: پروتئین CREB یک فاکتور مهم پایین‌دست بسیاری از مسیرهای علامتی به‌شمار می‌رود. با طراحی siRNA کارآمد برای ژن CREB می‌توان مسیرهای علامتی بسیاری از داروها را در سلول‌های مختلف به‌ویژه سلول K562 بررسی نمود. در این تحقیق میزان مهار بیان ژن CREB با به‌کارگیری دو siRNA مختلف برای این ژن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: طراحی siRNA براساس معیار Reynolds انجام گرفت. سلول‌های K562 با روش لیپوفکشن با siRNAها ترانسفکت شدند. بررسی اثر مهار بیان ژن CREB با استفاده از Real-time PCR کمی-نسبی انجام گرفت.

نتایج: طبق نتایج به‌دست آمده یکی از siRNAها اثر مهار بالایی برروی بیان CREB در سلول‌های K562 نشان داد، و بیان ژن CREB تا ۸۷ درصد در سلول‌های K562 کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از Real-time PCR نشان داد که از دو siRNA به‌کار رفته در سلول‌های K562 برای مهار ژن CREB1، فقط یکی از آن‌ها قدرت مهار با کارایی بالا را دارد. با توجه به این‌که هر دو siRNA مطابق با معیارهای Reynolds است، احتمالاً عوامل دیگری هم در مؤثر بودن siRNA دخالت دارند. برای مهار کارآمد یک ژن با siRNA بایستی بیش از یک siRNA برای قسمت‌های مختلف آن طراحی و آزمایش شود.

کلیدواژگان: siRNA، پروتئین CREB، سلول‌های K562، Real-time PCR

۱- مقدمه

یکی از مهم‌ترین و مؤثرترین راه‌های خاموش‌سازی ژن‌های سلول‌های جانوری است [۱-۳]. siRNAها، قطعات ۲۱-۲۸

مولکول‌های siRNA (small interfering RNA) که از اجزای عملکردی مسیر RNAi (RNA interference) هستند،

* نشانی مکاتبه: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

Email: zdeilami@yahoo.com

نوکلئوتیدی هستند و بیان ژن‌ها را در مرحله پس از رونویسی مهار می‌کنند. برای خاموش‌سازی ژن، siRNA با مجموعه‌های خاموش‌کننده القاء شده با RNA یا RISC (RNA-Induced Silencing Complex) همراه شده و با اتصال به RNA هدف موجب تجزیه آن می‌شوند [۱]. این سیستم به‌طور طبیعی در سلول‌های یوکاریوتی وجود داشته و در تنظیم بیان ژن‌ها در مرحله پس از رونویسی دخالت می‌کند. استفاده از siRNA یک روش جدید و مطمئن برای مطالعه عملکرد ژن‌ها در سلول‌های جانوری است [۴].

پروتئین CREB (Ca²⁺/cAMP response element binding protein) از فاکتورهای رونویسی است که فعالیت آن در پاسخ به بسیاری از محرک‌های سلولی مثل Ca²⁺، cAMP، هیپوکسی، نور ماورای بنفش (UV: Ultra Violet) و فاکتورهای رشد افزایش می‌یابد. مطالعات اخیر در موش‌های ترانس ژنیک نشان داده که CREB1 برای بقای سلول‌ها ضروری است. از طرفی بیان بیش از اندازه آن مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) را در سلول‌های T القاء می‌کند [۵، ۶]. با توجه به موارد گفته شده پروتئین CREB1 ممکن در مسیرهای علامتی اکثر فرایندهای سلولی نقش داشته باشد. برای مطالعه عملکرد CREB1 در انواع مسیرهای علامتی می‌توان از siRNA اختصاصی آن استفاده کرده و تأثیر آن را روی سلول مورد نظر بررسی نمود. معیارهای Reynolds یکی از راه‌هایی است که می‌توان برای طراحی siRNA استفاده کرد. براساس آن، ویژگی siRNA با ۳۰-۵۲ درصد GC، وجود سه نوکلئوتید A/U در ناحیه ۱۵ تا ۱۹، U در ناحیه ۱۰ و A در ناحیه ۱۹، عدم حضور تکرارهای داخلی، G/C در ناحیه ۱۹، G در ناحیه ۱۹ است. هرکدام از این موارد دارای یک امتیاز هستند و در نهایت امتیاز siRNA طراحی شده می‌تواند بین ۱ تا ۸ باشد و هر siRNA دارای امتیاز بیشتری باشد، می‌تواند در مهار بیان ژن مؤثرتر باشد [۶].

با این حال علاوه بر طراحی siRNA با اختصاصیت بالا، لازم است siRNA حتماً در یک مدل سلولی مناسب مورد آزمایش قرار گیرد. سلول‌های مورد استفاده در این تحقیق، سلول‌های K562 هستند. این سلول‌ها اریترولوکمیا (Erythrolukemia) هستند و با توجه به منشأ اریتروئیدی آن‌ها مدل سلولی مناسبی برای مطالعات مسیرهای علامتی تنظیم تولید هموگلوبین هستند [۷]. هدف از این

تحقیق طراحی CREB1 siRNA و بررسی دقیق میزان مهار آن در سلول‌های اریترولوکمیا K562 بود.

از دو siRNA که در این تحقیق استفاده شد، تنها یکی از آن‌ها مهار قابل توجهی از خود نشان داد و siRNA دیگر هیچ اثر مهاری از خود نشان نداد. نتایج این تحقیق می‌تواند در مطالعاتی که در رابطه با درک مسیر عملکردی بسیاری از داروها که احتمالاً با فعال کردن CREB1 عمل می‌کنند، مؤثر باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت سلول

سلول‌های K562 از بخش سلولی، دانشگاه Erasmus هلند تهیه شدند. سلول‌ها در محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Biosera) همراه با FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد (Biosera) در انکوباتور با ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند تا به تعداد ۱۰^۶ در هر میلی‌لیتر رسیدند [۸].

۲-۲- طراحی siRNA

یکی از راه‌های طراحی siRNA استفاده از نرم‌افزارهای موجود، مثل نرم‌افزارهای شرکت MWG است [۹]. برای مهار بیان ژن CREB1 دو نوع مختلف siRNA برای مکان‌های مختلف ژن CREB1 طراحی شد. مولکول siRNA ای که نتوانست به‌طور کارآمد موجب مهار ژن CREB1 شود به توالی ۵۹۸-۶۱۶ mRNA ژن CREB1 متصل شد و اتصال مولکول siRNA با کارایی بالا به ناحیه ۱۲۳۵-۱۲۵۲ ژن CREB1 صورت گرفت.

برای کنترل و تعیین میزان مهار ژن CREB1 لازم بود از یک siRNA منفی (Negative siRNA) نیز استفاده شود که این siRNA با هیچ mRNA ای رابطه مکملی نداشته و در نتیجه هیچ ژنی را مهار نمی‌کند. توالی siRNA منفی مورد استفاده به‌صورت 5' AGGUAGUGUAAUCGCCUUG 3' بود که از شرکت MWG تهیه شد.

۲-۴- رنگ آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده با

pSV-β-Galactosidase

رنگ آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده با pSV-β-Gal با استفاده از کیت β-Gal Staining Set (Roche) انجام گرفت. این کیت متشکل از بافر حاوی آهن (Iron buffer) (Roche) و (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) X-gal است که با ترکیب این دو محلول با نسبت مشخص می‌توان بیان ژن lacZ باکتریایی را در هر سلول ترانسفکت شده، مطالعه نمود. به این ترتیب سلول‌های ترانسفکت شده و تعداد آن‌ها با کمک میکروسکوپ نوری به راحتی قابل تشخیص هستند. برای تهیه تثبیت کننده (Fixative) مقدار ۵۴۰ میکرولیتر فرمالدهید ۳۷ درصد در ۹/۳۸ میلی لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) اضافه شده و در بن ماری دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم می‌شود. برای تهیه محلول رنگ آمیزی (Staining)، ۱ واحد از X-gal در ۱۹ واحد Iron buffer دقیق شده و به مدت ۱۰ دقیقه کاملاً مخلوط شد.

برای رنگ آمیزی سلول‌های سوسپانسیون K562، رسوب سلولی در ۱۰ میلی لیتر PBS حل شده و دوباره سانتریفوژ شد. محلول PBS حذف شده و سلول‌ها در ۱ تا ۲ میلی لیتر تثبیت کننده به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سلول‌ها رسوب داده شده و بلافاصله تثبیت کننده حذف شد و رسوب سلولی دو بار با PBS شسته شد. سپس در ۱ تا ۲ میلی لیتر محلول رنگ آمیزی حل شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ تا ۲۴ ساعت انکوبه می‌شود. سلول‌های رنگ شده با میکروسکوپ نوری معکوس مطالعه شد.

۲-۵- استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده با siRNAهای CREB1 و منفی با روش RNX انجام شد. رسوب سلول‌ها در ۱ میلی لیتر از محلول RNX-Plus (CinnaGen) اضافه شد و مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد و بعد از ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی به آرامی برداشته شد و هم حجم آن ایزوپروپانول (Merck) اضافه و

5' UGACUUAUCUUCGAUGCA tt3' 3' ACUGAAUAGAAGCUACGU 5'	سنس (Sense) آنتی سنس (Antisense)	توالی siRNA فاقد اثر مهاری بیان ژن CREB
5' GGUGGAAAAUGGACUGGCU tt3' 3' CCACCUUUUACCUGACCGA 5'	سنس آنتی سنس	توالی siRNA فاقد اثر مهاری بالا بیان ژن CREB

۲-۳- ترانسفکشن (Transfection) سلول‌ها

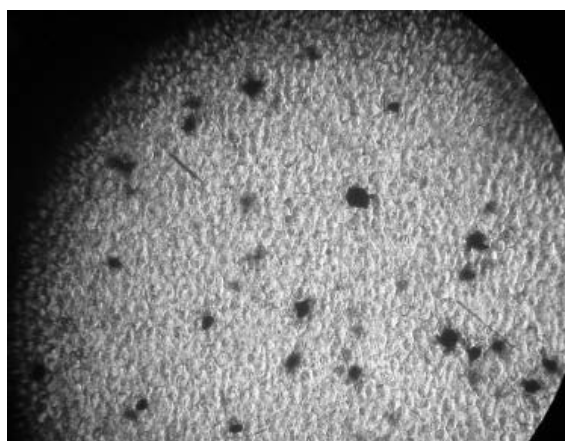
هر دو نوع siRNA ژن CREB1 با استفاده روش لیپوفکشن (Lipofection) به داخل سلول‌های K562 ترانسفکت شدند. برای مطالعه siRNA علاوه بر siRNA هدف، siRNA منفی نیز با توالی 3' AGGUAGUGUAAUCGCCUUG 5' استفاده شد. این siRNA با هیچ mRNA رابطه مکملی نداشته و بنابراین روی بیان هیچ ژنی را تأثیر نمی‌گذارد. برای هر نمونه کمپلکس لیپوفکتامین (Lipofectamine™ 2000) به شرح ذیل آماده شد: مقدار ۱۰۰ پیکومولار از siRNA در ۱۰۰ میکرولیتر RPMI بدون سرم، رقیق شده و به آرامی چند بار مخلوط می‌شود. مقدار ۲ میکرولیتر از لیپوفکتامین (Invitrogen) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI بدون سرم مخلوط شده و ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ترکیب siRNA و لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر مخلوط و ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کمپلکس Lipofectamine-DNA ایجاد شود. کمپلکس تشکیل شده به آرامی به محیط سلول‌ها اضافه شده و پلیت چند بار به آرامی تکان داده می‌شود تا کمپلکس در سطح پلیت کاملاً پخش شود. پلیت در انکوباتور با شرایط ۵ CO₂ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند [۱۰]. برای کنترل کارایی ترانسفکشن، در کنار سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA CREB1، در چاهک‌های جداگانه با همان شرایط ترانسفکشن پلاسמיד pSV-β-Galactosidase نیز به داخل سلول‌ها ترانسفکت شدند. در صورت وارد شدن پلاسמיד به سلول‌ها، بیان β-گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد که با رنگ آمیزی سلول‌ها به رنگ آبی نمایان می‌شوند.

فعال می‌شود. در هر چرخه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود که طی ۳۵-۴۰ چرخه ادامه داشت.

با استفاده از رنگ سایبرگرین (SYBR Green) میزان آمپلی‌فیکاسیون (Amplification) در هر چرخه دنبال شد. رنگ سایبرگرین با اتصال به DNA دو رشته‌ای علامت فلورسانس ساطع می‌کند. در چرخه‌ای که واکنش تکثیر وارد مرحله لگاریتمی می‌شود و تحت عنوان C_T (Threshold cycle) گفته می‌شود، میزان افزایش محصولات اندازه‌گیری می‌شود.

۳- نتایج

تصویری از میزان ترانسفکشن سلول‌های K562 در شکل ۱ آمده است. با شمارش سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pSV-β-Gal، میزان کارایی ترانسفکشن بررسی شد. تعداد سلول‌های آبی رنگ نمایانگر میزان ترانسفکشن است. در رابطه با سلول‌های K562 ۳۰-۴۰ درصد سلول‌ها آبی رنگ بودند. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و در هر سه مورد کارایی ترانسفکشن در همین حدود بود. در هر دو مورد، تعدادی سلول آبی کم‌رنگ هم مشاهده شد که نشان دهنده آن است که این سلول‌ها ترانسفکت شده‌اند و در مقایسه با سلول‌های پررنگ میزان بیان ژن β-گالاکتوزیداز کم بوده است.



شکل ۱ سلول K562 ترانسفکت شده با پلاسمید pSV-β-Gal سلول‌های آبی رنگ نشان‌دهنده ترانسفکت شدن سلول‌ها و بیان ژن β-گالاکتوزیداز است.

مقدار RNAهای سلول K562 ترانسفکت شده با siRNA

کاملاً مخلوط و سپس در دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. در انتها رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اتوکلاو شده حل شد. برای تعیین مقدار و کیفیت استخراج RNA علاوه بر اندازه‌گیری جذب نوری (Optical Density: OD) توسط فتومتر (Eppendorf)، در ژل الکتروفورز با آگارز ۱ درصد نیز بررسی شد. یک میکروگرم از RNA استخراج شده برای سنتز cDNA با استفاده از کیت RT-PCR (Bioneer) به کار رفت.

۲-۶- بررسی اثر مهار سیRNA

به‌منظور بررسی میزان مهار ژن CREB1 از کیت SYBR Green QuantiFast (QIAGEN) و دستگاه Real-time PCR (ABI-7500) استفاده شد. واکنش‌ها از نوع کمی-نسبی (Relative quantification) انجام شد که در آن بیان ژن هدف در مقایسه با بیان یک ژن خانه‌دار (House keeping) *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به‌عنوان کنترل داخلی مقایسه شد؛ سپس از فرمول زیر برای محاسبه بیان ژن استفاده شد [۱۱، ۱۲]:

$$\frac{\text{نمونه ۱}}{\text{نمونه ۲}} = \frac{2^{C_{T_{B1}} - C_{T_{B2}}}}{2^{C_{T_{A1}} - C_{T_{A2}}}} = 2^{(C_{T_{B1}} - C_{T_{B2}}) - (C_{T_{A1}} - C_{T_{A2}})} = 2^{\Delta\Delta C_T}$$

در آزمایش‌های این تحقیق فرمول فوق به این صورت خواهد بود:

$$2\Delta\Delta C_T = 2(\Delta CREB - \Delta GAPDH)$$

توالی آغازگری ژن *GAPDH* (کنترل داخلی) و *CREB1*

که از سایت اینترنتی Primer Bank طراحی شد، به‌صورت زیر است:

5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'	GAPDH-آغازگر جلویی
5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'	GAPDH-آغازگر برگشتی
5'-CACCTGCCATCACCCTGTAA-3'	CREB-آغازگر جلویی
5'-GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT-3'	CREB-آغازگر برگشتی

دما و شرایط انجام Real-time PCR به‌صورت زیر بود: گرمادهی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه که طی این مرحله *Taq* پلیمرز شروع داغ (Hot start *Taq* polymerase)

در سلول‌های K562 نشان می‌دهد. اندازه‌گیری مهار بیان CREB1 در کنار یک ژن کنترل داخلی (Endogenous) *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی صورت گرفته است. همچنین آزمایش‌ها به صورت دوتایی (Duplicate) انجام شد (شکل ۲).

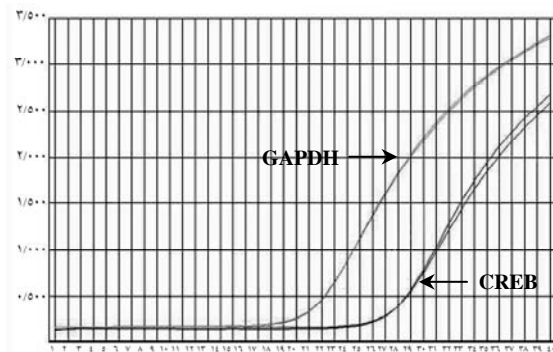
۴- بحث

فعالیت‌های سلول به وسیله مسیرهای علامتی هدایت می‌شود و شناسایی ژن‌های پایین دست مسیرهای علامتی می‌تواند کمک بزرگی در درمان بسیاری از بیماری‌ها باشد. یکی از راه‌های مطالعه مسیرهای علامتی، استفاده از فناوری siRNA است [۱]. مولکول‌های siRNA رونویسی ژن را در مرحله پس از رونویسی مهار می‌کنند و به دلیل اختصاصیت و کارایی بالا برای مهار بیان ژن و همچنین امکان انتقال آن به انواع سلول‌های جانوری مورد توجه هستند. در سال‌های اخیر برای مطالعه مسیر علامتی NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) و p53 از سیستم siRNA استفاده شده است که به دنبال آن چندین ژن درگیر در این مسیرها نیز شناسایی شده‌اند [۱۳، ۱۴].

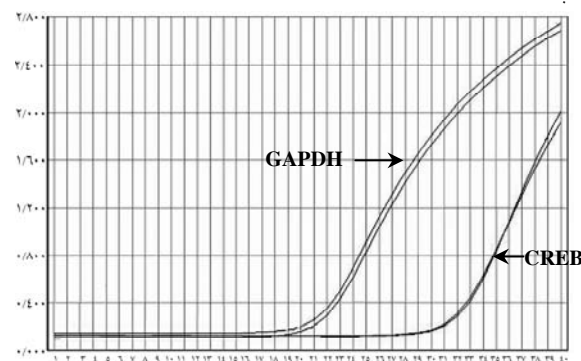
در این تحقیق دو siRNA برای مهار بیان ژن CREB1 در سلول‌های K562 بر طبق معیارهای Reynolds به کار گرفته شد و با توجه به این که دو توالی siRNA طراحی شده از امتیاز بالایی برخوردار بودند، با این حال تنها siRNA ای که به توالی ۱۲۳۵-۱۲۵۲ متصل می‌شد، با کارایی بالا توانست ژن CREB1 را در سلول‌های اریترولوکمیا K562 مهار کند. براساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ روی ویژگی‌های ترمودینامیکی siRNA انجام شده، مشخص شده که کمپلکس RISC می‌تواند به یکی از دو انتهای مولکول siRNA، وصل شده، سپس با خاصیت هلیکازی موجب جدا شدن دو رشته سنس و آنتی‌سنس siRNA شود. پایداری کامل یا نسبی جفت‌بازهای انتهای 5' دو رشته siRNA تعیین می‌کند که کدام یک از رشته‌های siRNA به عنوان آنتی‌سنس استفاده شده و در خاموشی ژن دخالت داشته باشد [۱۵]. در بین دو siRNA CREB1 که در این تحقیق استفاده شد، siRNA که اثر مهار از خود نشان نداد، در هر دو انتها دارای

منفی و CREB siRNA به ترتیب ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم میلی لیتر بود. میزان OD در ۲۶۰/۲۸۰ در هر نمونه‌های RNA فوق ۱/۸-۱/۹ بود. میزان OD در ۲۶۰/۲۸۰ وجود باندهای 18s و 28s نشان داد که RNAهای استخراج شده از سلول‌ها از کیفیت مطلوبی برخوردار است.

(الف)



(ب)



شکل ۲ منحنی‌های Real-time PCR مربوط به مهار ژن CREB1 در سلول‌های K562 است. الف: منحنی مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA؛ ب: منحنی مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با CREB1 siRNA. محور افقی مربوط به تعداد چرخه‌های PCR و محور عمودی مربوط به میزان افزایش فلورسانس سایبرگرین است. C_T سلول‌های K562 ترانسفکت شده با siRNA منفی در رابطه با ژن *GAPDH* ۲۱ و ژن CREB1 ۲۸ و C_T مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با CREB1 siRNA در مورد ژن *GAPDH* ۲۲ و ژن CREB1 ۳۲ است. میزان مهار ژن CREB با استفاده از فرمول $\Delta\Delta C_T$ محاسبه شد.

نتایج مربوط به CREB1 siRNA اول، اثر بازدارندگی مؤثری نشان نداد و CREB1 siRNA دوم اثر مهار ۸۷ درصد را در سلول K562 نشان داد.

شکل ۴ منحنی‌های Real time PCR مربوط به مهار ژن‌های CREB1 با siRNA دوم استفاده شده در این تحقیق را

پروتئین CREB1 به عنوان یک فاکتور رونویسی می تواند در پایین دست اکثر مسیرهای علامتی درون سلولی و مسیر علامتی بسیاری از داروها در فعال کردن بیان ژن های خاص نقش داشته باشد. [۱۶]

به این ترتیب طراحی یک siRNA کارآمد و مطمئن برای CREB1، می تواند نقش آن را در رابطه با بسیاری از مسیرها مشخص سازد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام کسانی که در این تحقیق ما را یاری کردند کمال تشکر را داریم.

جفت باز A=U بود. به این ترتیب کمپلکس RISC ممکن است به یکی از هر دو انتها متصل شود. در حالی که در مورد CREB siRNA دوم با اثر مهاری بالا، یکی از انتهای دارای جفت باز G≡C و انتهای دیگر دارای جفت باز U=A است. به این ترتیب اتصال RISC با انتهای 5' رشته آنتی سنس صورت گرفته و این siRNA به طور کارآمد توانسته با mRNA CREB متصل شده و اثر مهاری را در بیان ژن CREB1 در مرحله قبل از ترجمه انجام دهد.

به نظر می رسد برای استفاده از siRNA در مطالعه عملکرد ژن خاص، طراحی چند مولکول siRNA با هم و همزمان برای قسمت های مختلف ژن لازم باشد.

۶- منابع

- [1] Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: application in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(4): 318-28.
- [2] Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol* 2004; 33(3): 545-57.
- [3] Lee SH, Sinko PJ. siRNA--getting the message out. *Eur J Pharm Sci* 2006; 27(5): 401-10.
- [4] Mahmood-ur-Rahman, Ali I, Husnain T, Riazuddin S. RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans. *Biothechnol Adv* 2008; 26(3): 202-9.
- [5] Shi Y, Venkataraman SL, Dodson GE, Mabb AM, LeBlanc S, Tibbetts RS. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(16): 5898-903.
- [6] Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22(3): 326-30.
- [7] Delgado-Cañedo A, Chies JA, Nardi NB. Induction of fetal haemoglobin expression in erythroid cells—a model based on iron availability signalling. *Med Hypotheses* 2005; 65(5): 932-6.
- [8] Woessmann W, Zwanzger D, Borkhardt A. ERK signaling pathway is differentially involved in erythroid differentiation of K562 cells depending on time and the inducing agent. *Cell Biol Int* 2004; 28(5): 403-10.
- [9] Schramm G, Ramey R. siRNA design including secondary structure target site production. *MWG Biotech* 2005; <http://www.nature.com/naturemethods>.
- [10] Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 2004; 33(2): 95-103.

- [11] Bustin, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2): 169-93.
- [12] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 95-125.
- [13] Zheng L, Liu J, Batalov S, Zhou D, Orth A, Ding S, Schultz PG. An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(1): 135-40.
- [14] Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Cavet G, Linsley PS, Beijersbergen RL, Bernards R. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 2004; 428(6981): 431-7.
- [15] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115(2): 209-16.
- [16] Sangerman J, Lee MS, Yao X, Oteng E, Hsiao CH, Li W, Zein S, Ofori-Aquach SF, Pace BS. Mechanism for fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves gamma-globin activation by CREB1 and ATF-2. *Blood* 2006; 108(10): 3590-9.

راه اندازی آزمایش الایزا برای تعیین عیار آنتی بادی ضد ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک و مقایسه نتایج با روش خنثی سازی ویروس

کبرا رضوی پاشاییگ^۱، حوریه سلیمان جاهی^{۲*}، یاشار محمدزاده صدیق^۱، محمدحسن روستایی^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۲۰

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

چکیده

هدف: ویروس های هرپس سیمپلکس، عامل عفونت های انسانی مسئول تولید عفونت های ماندگار و نهفته، در سراسر جهان محسوب می شوند. عفونت های ویروس هرپس سیمپلکس اغلب به صورت مستمر در جمعیت نرمال عود مکرر دارند اما در افراد با نقص سیستم ایمنی مشکلاتی را ایجاد می کند.

مواد و روش ها: در این تحقیق ابتدا ویروس های هرپس سیمپلکس در سلول های BK تکثیر یافت و عیار آنتی بادی ها علیه ویروس هرپس سیمپلکس در ۵۰۲ نمونه جمع آوری شده با آزمون خنثی سازی ویروس به عنوان استاندارد طلایی و الایزای طراحی شده تعیین شد.

نتایج: براساس نتایج به دست آمده به ترتیب ۸۰/۴۸ و ۸۱/۶۷ درصد عیار بیش از ۱/۸ در آزمون خنثی سازی ویروس و الایزا داشتند ضریب پیرسون بین متغیرهای مورد بررسی ۰/۹۶ محاسبه شد که نشان دهنده ارتباط معنی دار و نزدیک بین متغیرهای مورد بررسی فوق می باشد (ضریب پیرسون=۰/۹۶).

نتیجه گیری: اطلاعات به دست آمده نشان داد که آزمون الایزای طراحی شده می تواند برای غربالگری و بررسی شیوع آنتی بادی های ضد هرپس سیمپلکس نوع ۱ استفاده شود که به نوبه خود در سازماندهی بیماران خاص برای درمان با به کارگیری روش های آزمایشگاهی کم هزینه و مناسب مؤثر است.

کلیدواژگان: ویروس های هرپس سیمپلکس، خنثی سازی ویروس، آزمون الایزا

۱- مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک (Herpes Simplex Virus type-1: HSV-1) از خانواده هرپس ویریده در جنس سیمپلکس ویروس دارای ژنوم DNA دو رشته ای است [۱، ۲]. این ویروس عامل ایجاد طیف وسیعی از بیماری های انسانی شامل عفونت های سیستمیک در نوزادان و افراد دارای نقص ایمنی، عفونت های موضعی غشاهای مخاطی، پوست، قرنیه،

ارگان های تناسلی و همچنین شایع ترین علت آنسفالیت تک گیر در ایالات متحده است [۳، ۴]. آنتی بادی های خنثی کننده و ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) پاسخ های وابسته به کمپلمان، ۲ تا ۶ هفته پس از عفونت ظاهر می شوند و مادام العمر باقی می ماند [۴]. این ویروس گسترش وسیعی در طبیعت و جوامع مختلف انسانی دارد [۲، ۳] در اثر

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵

تکثیر ویروس در کشت یاخته آثار تخریب ناشی از آن شامل بالونی شدن یاخته های آلوده، تولید انکلوژن بادی های (Inclusion bodies) داخل هسته ای، تشکیل یاخته های غول پیکر چندهسته ای، حاشیه نشینی کروماتین دیده می شود. با وجود این که عفونت های ویروس هرپس در تمام نقاط جهان گستردگی دارند اما در کشورهای در حال توسعه به دلیل سطح پایین بهداشت، دارای شیوع بسیار بالایی هستند [۵]. با توجه به افزایش روزافزون عفونت های هرپسی در دستگاه تناسلی و به دنبال آن عفونت های هرپسی نوزادان و این که این ویروس در نوزادان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی معمولاً بیماری کشنده ایجاد می کند و تشخیص به موقع و درمان می تواند از تعداد مرگ و میر بکاهد [۱، ۵]، بنابراین طراحی روشی سریع و حساس و مقرون به صرفه برای تشخیص عفونت و نیز به عنوان آزمون مناسب برای غربالگری در جامعه در معرض خطر "نوزادان، سالمندان و افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف شده" به منظور سازماندهی درمان، مورد نیاز است. بدین منظور از بین روش های تشخیص سرولوژیکی این ویروس، آزمایش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) و آزمایش خنثی سازی ویروس (Virus Neutralization Test: VNT) راه اندازی و با هم مقایسه شدند.

در این پژوهش، ELISA با کیت طراحی شده در آزمایشگاه که می تواند به عنوان آزمون بومی برای غربالگری محسوب شود انجام شد و آزمایش VNT به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد.

۲- مواد و روش ها

در این تحقیق ابتدا ویروس HSV-1 در سلول های BK (R_Kh_BK) (تیره یاخته ای رازی- خدمتی) با محیط (Dulbecco's Modified Eagles Medium) DMEM تکثیر شد و به روش اسپرمن- کاربر (Spearman-Karber) تیتراژ آن $10^{-7.5}$ (TCID₅₀) در میلی لیتر تعیین شد. آزمایش VNT به روش رقت ثابت ویروس- رقت متغیر سرم (Constant Virus-Varying Serum Dilutions) برای تعیین عیار آنتی بادی ها علیه HSV-1 در ۵۰۲ نمونه پلاسمای

انسانی تهیه شده از سازمان انتقال خون، از بین اهداکنندگان نوبت اول که همگی دارای سن بالاتر از ۱۸ سال و به طور تصادفی جمع آوری شده بود، انجام شد.

برای انجام این آزمون ابتدا تک لایه ای از سلول های BK در میکروپلیت ۹۶ خانه ای (NUNC) با محیط کشت DMEM آماده شد، نمونه های سرمی تحت مطالعه به مدت نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد به منظور حذف عوامل کمپلمان حرارت داده شدند، سپس رقت های متوالی سرم (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸، ۱/۲۵۶، ۱/۵۱۲) در میکروپلیت ۹۶ خانه ای محتوی محیط کشت فاقد سرم تهیه شد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروسی با رقت $10^{-0.75}$ (معادل TCID₅₀ ۱۰۰ ذره ویروسی) بود، به حجم مساوی از رقت های تهیه شده نمونه های سرمی اضافه و میکروپلیت به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا واکنش بین آنتی بادی های احتمالی موجود در سرم و ذرات ویروسی رخ دهد؛ سپس از هر چاهک محتوی سرم و ویروس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک همتای خود در میکروپلیت دیگری که حاوی تک لایه سلولی BK بود، اضافه شد. میکروپلیت واجد نمونه یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا اگر ویروس خنثی نشده ای موجود باشد جذب سلول ها شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به چاهک ها اضافه و دوباره به گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد. نتایج آثار تخریب سلولی ناشی از تکثیر ویروس (Cytopathic effect: CPE) بعد از ۲۴ ساعت بررسی و ثبت شد. عیار آنتی بادی موجود در نمونه های سرمی برابر با بالاترین رقت سرمی است که بتواند مانع از فعالیت ویروس در کشت سلول و بروز CPE شود محاسبه شد [۳].

سپس آزمون VNT به عنوان استاندارد طلایی برای طراحی ELISA مورد استفاده قرار گرفت که به روش غیر رقابتی و غیر مستقیم با ویروس کامل راه اندازی شد. برای استاندارد کردن این آزمون از روش چکر بورد (Cheker Bord) به ترتیب زیر استفاده شد:

۱- در ابتدا رقت های حاوی ۱ و ۵ و ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی ژن [سوسپانسیون ویروس HSV-1

تعیین غلظت شده با برادفورد (Bradford)؛ با بافر ELISA (بافر ۱۰ میلی مولار فسفات سالین با pH= ۶/۸-۷) تهیه شد. به همین ترتیب رقت‌های ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۵۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۵۰۰ از پلاسمای افراد نیز در بافر رقیق کننده آنتی‌بادی (برای تهیه این بافر به بافر ELISA ۰/۱ درصد آلبومین سرم گاوی BSA (Bovine Serum Albomin) اضافه شد. این بافر برای رقیق کردن آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به کار می‌رود) تهیه شد. سپس از هر رقت آنتی‌ژن به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در ۲ چاهک میکروپلیت مخصوص ELISA (NUNC) ریخته شد و میکروپلیت به مدت ۱۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این عمل برای اتصال (Coating) آنتی‌ژن به کف چاهک میکروپلیت صورت گرفت. در این مرحله به ازای هر چاهک واجد آنتی‌ژن ویروسی یک چاهک به عنوان کنترل منفی آنتی‌ژن در نظر گرفته شد که در آن محیط کشت جمع‌آوری شده از روی سلول‌های BK غیرآلوده به ویروس ریخته شد؛

۲- پس از گرماگذاری ذکر شده میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج شده و تمامی چاهک‌ها در شرایط یکسان توسط بافر شستشو (بافر ELISA فاقد NaCl که دارای توئین ۲۰ به مقدار ۱۲۵ میکرولیتر در هر لیتر است) ۴ بار مورد شستشو قرار گرفتند؛

۳- در مرحله بعد ۱۵۰ میکرولیتر از محلول مسدود کننده (به میزان ۱ گرم BSA در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر ELISA حل شد) به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و به مدت یک ساعت میکروپلیت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. این مرحله بدین منظور انجام شد که نقاطی از کف چاهک‌ها، که هیچ‌گونه آنتی‌ژن ندارند، توسط ماده موجود در محلول مسدود کننده (BSA) پوشیده شوند تا در مراحل بعد بروز واکنش‌های غیراختصاصی به حداقل میزان خود برسد؛

۴- میکروپلیت از گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد خارج و ۴ بار شستشو داده شد؛

۵- رقت‌های پلاسمای مثبت و منفی تهیه شده به نحوی به چاهک‌ها اضافه شدند که تمام رقت‌های تهیه شده از سرم مثبت یا منفی در معرض تماس با تمام رقت‌های تهیه شده از

آنتی‌ژن باشند و برای هر رقت ۲ چاهک برای پرهیز از خطای احتمالی در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که برای کنترل نمودن نمونه‌های سرم مثبت و منفی ۲ میکروپلیت جداگانه حاوی آنتی‌ژن ویروسی تهیه و به‌طور جداگانه ارزیابی شد و پلیت‌ها به مدت یک و نیم ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند؛

۶- مرحله شستشو ۴ بار تکرار شد؛

۷- آنتی‌بادی کونژوگ با پراکسیداز (Horse Radish Peroxidase: HRP) با رقت ۱/۱۵۰۰، ۱/۳۰۰۰، ۱/۴۰۰۰ طوری به چاهک‌ها افزوده شد که هر رقتی از آنتی‌ژن و سرم در مقابل با هر سه رقت از رقت‌های آنتی‌بادی ثانویه قرار گیرد و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛

۸- مرحله شستشو ۶ بار انجام گرفت تا آنتی‌بادی کونژوگ اضافی کاملاً شستشو شود؛

۹- به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا-کروموزن (Chromoden)، تترا متیل بنزیدین (Tetramethylbenzidine: TMB) اضافه شد و به مدت ۱۰-۱۲ دقیقه در دمای اتاق و دور از نور نگهداری شد؛

۱۰- در این مرحله با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ مولار واکنش رنگزایی متوقف شد؛

۱۱- نتایج توسط دستگاه قرائت‌گر ELISA (ELISA Reader) در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت شد؛

در تمامی آزمایش‌های فوق و در هر سری آزمایش ELISA، کنترل‌های مثبت و منفی آنتی‌ژن، کنترل‌های مثبت و منفی سرم بیمار و همچنین کنترل آنتی‌بادی کونژوگ وجود داشت.

بالاترین رقت آنتی‌ژن که بیشترین اختلاف را در جذب نمونه‌های پلاسمای مثبت و منفی در مقایسه با کنترل منفی آنتی‌ژن داشتند به عنوان مناسب‌ترین رقت ویروس و آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ثانویه محسوب شد. برای تعیین رقت آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ثانویه و نیز غلظت آنتی‌ژن آزمایش با سرم‌های استاندارد تعیین عیار شده انجام گرفت و بنابراین رقت ۱/۵۰۰ از آنتی‌بادی اولیه (سرم افراد تحت آزمایش) و رقت ۱/۴۰۰۰ از آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti human IgG conjugated with HRP) و

۱۰ میلی گرم در ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی ژن (سوسپانسیون ویروس که با روش برادفورد تعیین غلظت شده بود) به منظور انجام آزمایش ها در نظر گرفته شد. در این روش، ابتدا آنتی ژن مورد نظر به فاز جامد (پلیت ۹۶ خانه ای NUNC) متصل شد و پس از افزودن آنتی بادی اولیه و انجام مراحل شستشو، آنتی بادی ثانویه اضافه و در نهایت با افزودن سوبسترای کروموژن TMB، میزان تغییر رنگ که در نتیجه فعالیت آنزیم متصل به آنتی بادی ثانویه است، توسط دستگاه قرائت گر ELISA در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه گیری شد که در واقع میزان فعالیت آنزیم به طور غیرمستقیم میزان آنتی بادی را معین می کند.

سپس آزمون ELISA به ترتیب زیر انجام شد:

۱- به چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای ELISA، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت آنتی ژن که حاوی ۱۰ میکروگرم از آنتی ژن ویروسی است، اضافه شد و در مقابل هر چاهک از آنتی ژن یک چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل منفی آنتی ژن با همان غلظت پروتئینی افزوده شد و به مدت ۱۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت؛

۲- مرحله شستشو ۴ بار انجام گرفت؛

۳- ۱۵۰ میکرولیتر از محلول مسدود کننده به تمامی چاهک ها افزوده شد و به مدت یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت؛

۴- مرحله شستشو تکرار شد؛

۵- رقت ۱/۵۰۰ از نمونه های پلاسما با بافر رقیق کننده آنتی بادی تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک های حاوی آنتی ژن و کنترل منفی آنتی ژن، افزوده شد. میکروپلیت به مدت یک و نیم ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت؛

۶- مرحله شستشو تکرار شد؛

۷- رقت ۱/۴۰۰۰ از آنتی بادی ثانویه تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به تمامی چاهک ها افزوده شد؛

۸- شستشو ۶ بار انجام گرفت؛

۹- در این مرحله به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا- کروموژن (TMB) اضافه و به مدت ۱۰-۱۲ دقیقه

دور از نور نگهداری شد؛

۱۰- برای متوقف کردن واکنش رنگ زایی، ۵۰ میکرولیتر

اسیدسولفوریک ۲ مولار به چاهک ها افزوده شد؛

۱۱- نتایج توسط دستگاه قرائت گر ELISA در طول موج

۴۹۲ نانومتر قرائت شد.

نتایج ELISA با تعیین سطح حداقل (Cut off) محاسبه شد. برای این منظور ۲۰ نمونه پلاسمایی که با VNT و کیت ELISA تجاری نتایج منفی داشتند توسط ELISA طراحی شده آزمایش شدند و میانگین جذب نوری آن ها برابر با ۰/۴ شد که به عنوان سطح حداقل در نظر گرفته شد [۶-۸].

۳- نتایج

در آزمایش VNT نمونه هایی که عیار آنتی بادی کمتر از ۱/۸ شد به عنوان منفی در نظر گرفته شدند در نتیجه ۹۸ نمونه غیرایمن (منفی) و ۴۰۴ نمونه ایمن (مثبت) تشخیص داده شد (جدول ۱).

جدول ۱ فراوانی عیار آنتی بادی در نمونه های پلاسمای تحت آزمایش VNT

عیار VNT	فراوانی	درصد فراوانی
۱/۸ <	۹۸	۱۹/۵۲
۱/۸	۴۸	۹/۵۶
۱/۱۶	۵۸	۱۱/۵۵
۱/۳۲	۱۰۴	۲۰/۷۲
۱/۶۴	۱۰۵	۲۰/۹۲
۱/۱۲۸	۶۶	۱۳/۱۵
۱/۲۵۶	۱۸	۳/۵۸
۱/۵۱۲	۵	۰/۹۹
مجموع	۵۰۲	۱۰۰ درصد

آزمون ELISA طراحی شده نیز روی تمام نمونه ها انجام شد و نتایج به این ترتیب به دست آمد که: ۹۲ نمونه (۱۸/۳۳ درصد از کل نمونه ها) غیرایمن و ۴۱۰ نمونه (۸۱/۶۷ درصد از کل نمونه ها) ایمن تشخیص داده شدند. تمام نمونه های غیرایمن با ELISA با VNT هم غیرایمن تشخیص داده شدند (جدول ۲).

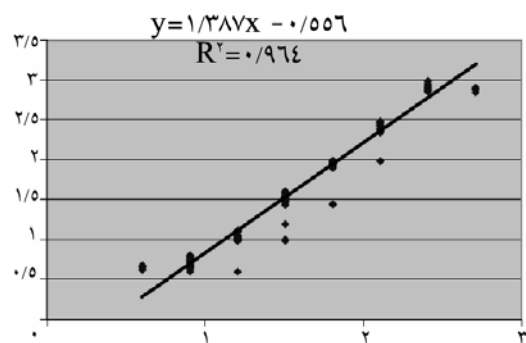
جدول ۲ اعتبار آزمون ELISA

نتایج VNT	VNT مثبت	VNT منفی	
نتایج ELISA مثبت	۳۸۳	۲۷	۴۱۰
نتایج ELISA منفی	۲۱	۷۱	۹۲
کل	۴۰۴	۹۸	۵۰۲

براساس نتایج به دست آمده از مقایسه این دو آزمون، حساسیت آزمون ELISA برابر ۰/۹۴ و ویژگی آن برابر ۰/۷۲ محاسبه شد.

با به کارگیری نرم افزار آماری Excel و با توجه به اطلاعات به دست آمده از نمونه های پلاسمای مربوط، توسط ELISA طراحی شده و آزمایش VNT معادله خط رگرسیون (Regression) پس از رسم Scatter Plot (شکل ۱) به دست آمد که عبارت است از:

۰/۵۵۶ - (لگاریتم ارزش خشتی سازی) $ELISA = 1/3873$ (جذب نوری همچنین میزان ضریب پیرسون (Pearson) برای متغیرهای فوق ۰/۹۶ تعیین شد که نشان دهنده ارتباط معنی دار و بسیار نزدیک بین متغیرهای مورد بررسی است.



شکل ۱ Scatter Plot مربوط به ELISA طراحی شده و VNT

۴- بحث

HSV از جمله شایع ترین و مسری ترین ویروس های بیماری زا در انسان است. بسیاری از عفونت های ایجاد شده بدون علامت بوده و از راه دهان، دستگاه تنفس، تماس مستقیم شخص به شخص، بزاق، تماس جنسی و در زمان عبور نوزاد از کانال زایمان در زنانی که به نوع یک و دو ویروس در

دستگاه تناسلی مبتلا هستند، انتقال می یابد [۲]. عفونت اولیه معمولاً به صورت تاول های مجتمع و دسته ای روی پوست یا غشاهای مخاطی ظاهر می شود که به شکل التهاب دهان، التهاب لثه ها و التهاب حلق نیز مشاهده می شود. این ویروس ها در نوزادان و افراد دارای نقص در سیستم ایمنی می تواند باعث آلودگی کبد، غدد آدرنال، چشم ها و به دنبال آن کوری شود. همچنین با هجوم به سیستم اعصاب مرکزی و مغز باعث بروز آسفالیت، مننژیت و مرگ می شود [۹،۳،۱].

در کشور ما هم با توجه به اطلاعات کتابخانه ای و مراجعه به منابع، مطالعات مشابه کم و اغلب در جمعیت های محدود یا برای راه اندازی آزمون انجام گرفته است [۱۰،۸]. در مطالعه ای که در سال های اخیر در ژاپن انجام شده است نشان داده شده که شیوع HSV-1 و HSV-2 در مراجعه کنندگان به کلینیک در سنین ۱۶- ۴۰ سال ۶۳ درصد بوده است [۱۱].

در مطالعه دیگر با دو روش ELISA و VNT در کودکان عیار آنتی بادی به ترتیب ۶۲/۶ درصد و ۵۷/۳ درصد با ELISA و VNT نشان داده شده است [۱۲]. در مطالعه ای در سال ۲۰۰۵ میلادی در هند، شیوع HSV-1 و HSV-2 در مراجعه کنندگان به کلینیک در سنین ۱- ۱۴ سال به ترتیب ۸۵/۲ و ۷۷/۳ درصد گزارش شده است [۱۱].

با توجه به اهمیت عفونت های هرپس تشخیص به موقع در افراد حساس و اقدام برای درمان و سازماندهی بیماران بسیار ضروری است. در این مطالعه با طراحی آزمون ELISA خانگی ضمن تعیین عیار ویروس حساسیت و ویژگی آزمون محاسبه شد.

برای به دست آوردن یک ارتباط منطقی مابین جواب های به دست آمده از کیت ELISA به کار رفته در پژوهش حاضر با نتایج حاصل از آزمایش VNT، با استفاده از علم آمار حیاتی و نرم افزاری آماری Excel معیارهایی نظیر میزان همبستگی بین کیت مذکور و آزمایش VNT ارزیابی و این طور تعیین شد که لگاریتم بر مبنای ۱۰ عیار به دست آمده برای هر نمونه پلاسمای می تواند رابطه منطقی تری با جذب نوری قرائت شده نمونه مذکور، توسط کیت ELISA داشته باشد. به همین منظور میزان (R-Square) ضریب پیرسون بین جذب های نوری قرائت شده توسط کیت ELISA و نتایج حاصل

نیاز به تهیه سرم و مواد در شرایط استریل، روش ELISA به عنوان روش جایگزین VNT برای نشان دادن آنتی بادی ضد HSV در نمونه های سرم به ویژه در مطالعات اپیدمیولوژیکی و میدانی باشد و می تواند برای غربالگری به کار رود.

از آزمایش VNT محاسبه شد. به طور کلی چنانچه میزان ضریب پیرسون محاسبه شده بین دو متغیر یک یا نزدیک به یک باشد نشان دهنده ارتباط کامل و معنی دار بین دو متغیر مورد بررسی است. چنانچه این میزان (۱-) باشد نشان دهنده ارتباط معکوس بین دو متغیر است و چنانچه این ضریب صفر محاسبه شود نشان دهنده عدم ارتباط بین متغیرهای مورد آزمایش است.

حال با توجه به این که ضریب پیرسون محاسبه شده در این پژوهش ۰/۹۶ است، بنابراین ارتباط بین متغیرهای مورد بررسی فوق، معنی دار و نزدیک است.

با توجه به این نتایج و سادگی و سرعت انجام کار و عدم

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی از انجام پژوهش و سازمان انتقال خون برای تأمین نمونه های پلاسمایی صمیمانه تشکر می نمایند.

۶- منابع

- [1] Nesburn AB, Ghiasi H, Wechsler SL. Ocular safety and efficacy of an HSV-1 gD vaccine during primary and latent infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(8): 1497-502.
- [2] Cleator G, Klapper P, Herpes simplex, In: *Principles and practice of clinical virology*. WILY 2000; p: 23-45.
- [3] Roizman B and Knipe G, Herpes simplex viruses. Vol. 2, Lippicott Williams & Wilkins: *Fields virology*, 2007; p: 2501-603.
- [4] Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis* 1998; 26(3): 541-53.
- [5] Osorio Y, Ghiasi H. Recombinant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) codelivering interleukin-12p35 as a molecular adjuvant enhances the protective immune response against ocular HSV-1 challenge. *J Virol* 2005; 79(6): 3297-308.
- [6] Arama V, Vladareanu R, Mihailescu R, Streinu Cercel A, Mihai C, Hristea A, Iosipenco M, Arama SS, Rabilloud M. Seroprevalence and risk factors associated with herpes simplex virus infection among pregnant women. *J Perinat Med* 2008; 36(3): 206-12.
- [7] Sauerbrei A, Wutzler P. Laboratory diagnosis of central nervous system infections caused by herpesviruses. *J Clin Virol* 2002; 25(suppl 1): S45-51.
- [8] Zandi K, Roostae MH, Sadeghizadeh M, Rasae MJ, Sajedi RH, Soleimanjahi H. Production of recombinant gG-1 protein of herpes simplex virus type 1 in a prokaryotic system in order to develop a type-specific enzyme-linked immunosorbent assay kit. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50(3): 319-23.
- [9] Naito K, Hashimoto T, Ikeda S. Herpes simplex virus type-1 meningoencephalitis showing disseminated cortical lesions. *Intern Med* 2007; 46(11): 761-3.
- [10] Ziyaeyan M, Japoni A, Roostae MH, Salehi S, Soleimanjahi H. A serological survey of Herpes Simplex Virus type 1 and 2 immunity in pregnant women at labor stage in Tehran, Iran. *Pak J Biol Sci* 2007; 10(1): 148-51.
- [11] Kaur R, Gupta N, Baveja UK. Seroprevalence

- of HSV1 and HSV2 infections in family planning clinic attenders. J Commun Dis 2005; 37(4): 307-9.
- [12] Artiran Igde F, Igde M, Yazici Z, Okur Gumusova S, Birinci A, Sancak R, Ozturk F. Distribution of HSV-1 IgG antibodies by two methods comparing in Turkish atopic children. New Microbiol 2007; 30(2): 109-12.

بررسی انگل‌شناسی حلزون لیمنه پالوستریس و شناسایی اکولوژی آن در استان مازندران با استفاده از سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS)

عبدالرضا صلاحی مقدم^{۱*}، امیرحسین محوی^۲، غلامرضا مولوی^۳، اسدالله حسینی چگینی^۴، جعفر مسعود^۵

- ۱- استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس، هرمزگان، ایران
- ۲- استادیار، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۵

چکیده

هدف: لیمنه پالوستریس حلزون آب شیرین است که در گزارش‌های علمی از استان مازندران به ثبت رسیده است. این حلزون می‌تواند میزبان واسط برخی ترماتودهای انگلی حیوانی باشد که گاه در انسان نیز دیده می‌شود. گزارش‌هایی در دست است که این حلزون می‌تواند میزبان واسط فاسیولا هیپاتیکا نیز باشد. از آن‌جا که گزارشی از کم و کیف آلودگی و اکولوژی حلزون‌های فوق در استان مازندران در دست نیست، این بررسی به‌منظور بازنگری و مطابقت مطالعات قبلی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی بیش از ۱۸۱ نقطه استان مازندران بررسی شد. در ۳۶ مورد که دارای شرایط لازم برای جمع‌آوری حلزون دانسته شد، ۴۹۰ حلزون لیمنه پالوستریس جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه پس از تشخیص نوع حلزون، با استفاده از روش له کردن حلزون‌ها، اشکال احتمالی انگلی موجود در آن با لوپ حشره‌شناسی بررسی شد سپس اطلاعات حاصل همراه با برخی اطلاعات اکولوژی منطقه در نرم‌افزارهای Microsoft Office و سیستم اطلاعات جغرافیایی مشتمل بر نرم‌افزار ArcGIS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و به رشته تحریر درآمد.

نتایج: از ۴۹۰ حلزون لیمنه پالوستریس صید شده، ۶ مورد (۱/۲۲ درصد) آلودگی به اکینوستوما سرکریا دیده شد. دمای مناسب زیست حلزون حدود ۱۵ تا ۱۹ درجه سلسیوس بوده و میزان املاح آب کلونی‌های این حلزون نیز حدود ۲۰۰ تا ۴۰۰ قسمت در میلیون بوده است. جمعیت کلونی‌های حلزون در فصول پاییز و زمستان افزایش یافته اما آلودگی حلزون در تابستان مشاهده شده است.

نتیجه‌گیری: این تحقیق توانست شرایط اقلیمی مورد نیاز حلزون، پراکندگی، پایش جمعیت حلزون را روشن کند. همچنین میزبان واسط برخی اکینوستوماهای پرندگان (اردک‌های) محلی را که تاکنون چندان مورد بررسی قرار نگرفته بود را نشان دهد. چنین به نظر می‌رسد که برای تأسیس مزارع پرورش اردک و بوقلمون، الگوی اکولوژیک ساده‌ای که ارائه شد می‌تواند مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: اکولوژی، سرکر، حلزون‌شناسی، لیمنه پالوستریس، مازندران

* نشانی مکاتبه: هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی، صندوق پستی: ۷۹۱۴۹-۶۴۱۵۳

Email: asmoghaddam@yahoo.com

۱- مقدمه

حلزون‌ها میزبانان واسطه گروه بزرگی از کرم‌های انسانی و حیوانی هستند که به «کرم‌های منتقله از حلزون» معروف هستند [۱]. این کرم‌ها با استثناهایی از گروه ترماتودها (Trematoda) هستند. در این میان، انواع شیشستوزوما (*Schistosoma*)، که از معضلات بهداشتی برخی نقاط جهان هستند [۲] و همچنین انواع فاسیولا (*Fasciola*) حائز اهمیت‌اند [۳]. در کشور ما فاسیولیازیس (*Fascioliasis*) از ابعاد حیوانی یا انسانی دارای اهمیت زیادی است [۴]. تا چندی پیش شیشستوزومیازیس (*Schistosomiasis*) یکی از بیماری‌های مهم کشور محسوب می‌شد و گزارش‌های آن از استان خوزستان موجود است [۵].

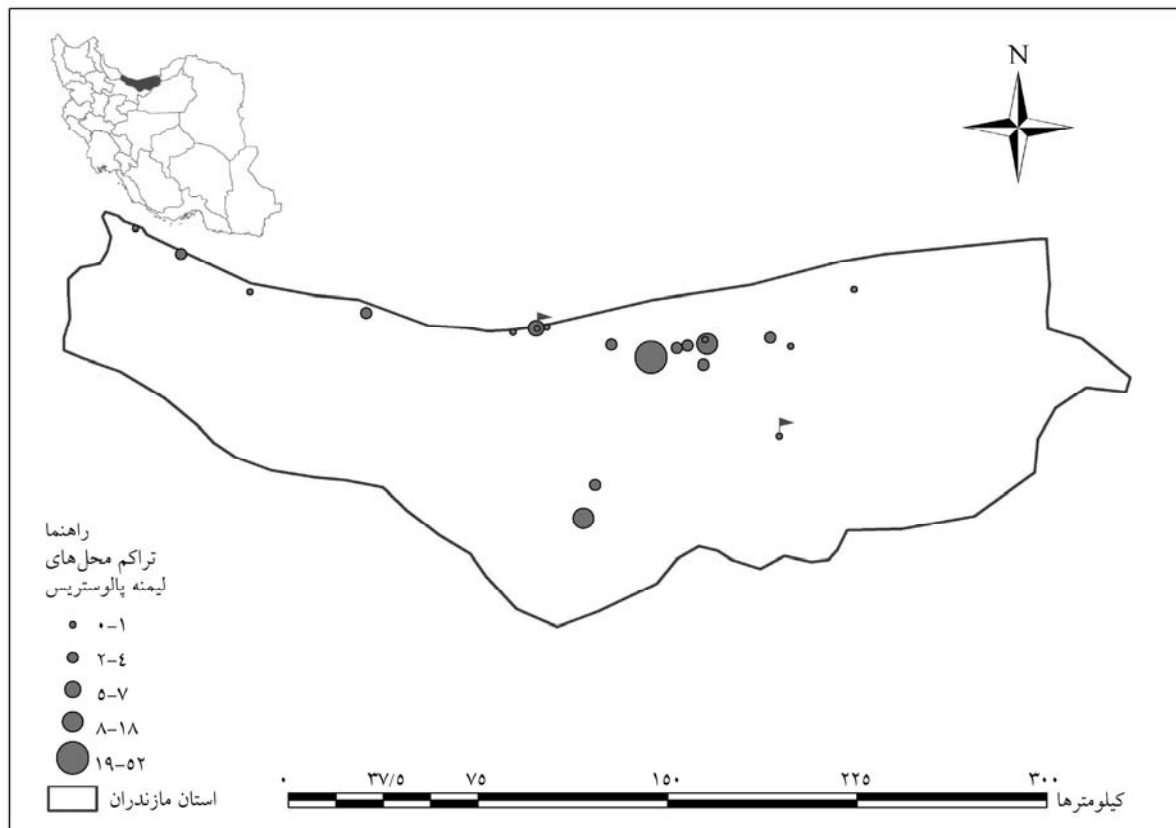
اساساً اشراف به وضعیت حلزون‌های منطقه و پتانسیل وجود بیماری‌های انگلی مربوط یکی از الزامات پایه برای پایش سلامت و بیماری است. تا چندی پیش حلزون ناقل شیشستوزومیازیس هماتوبیوم (*Schistosomiasis haematobium*) (بولینوس ترانکاتوس: *Bulinus truncatus*) در استان گیلان وجود نداشت اما بعدها این حلزون در آن استان دیده شد [۶]. این موضوع پویا بودن اکوسیستم‌ها و ضرورت پایش مدام حلزون‌های منطقه را در شهرستان‌های مختلف بیان می‌دارد. مطالعه قبلی در استان مازندران توسط دکتر منصوریان (Mansoorian) و همکاران بیانگر وجود برخی حلزون‌های ناقل در منطقه بود در این میان انواع لیمنه (*Lymnaea*) از جمله حلزون‌های موجود در سطح استان بوده است [۷] که به وفور در سایر استان‌ها نیز دیده می‌شود [۸]. لیمنه پالوستریس (*L. palustris*) حلزون بزرگ‌تری در مقام مقایسه با (لیمنه) گالبا ترانکاتولا (*Galba truncatula*) است و گذشته از ابعاد بزرگ آن که ممکن است تا ۲-۳ سانتی‌متر برسد، فاقد پیچش‌های برجسته یا سوچرهای عمیق (*Sutures*) است و در نمای کلی پوسته آن کشیده‌تر به نظر می‌رسد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که لیمنه پالوستریس در برخی نقاط می‌تواند میزان واسطه فاسیولا هپاتیکا (*Fasciola hepatica*) باشد [۹]. با توجه به

مطالعات قبلی مبنی بر وجود حلزون در منطقه و نبودن اطلاعات لازم در مورد آلودگی حلزون‌های فوق، این بررسی به‌منظور بازنگری مطالعات قبلی در استان مازندران و نقش احتمالی این حلزون در انتقال انواع انگل فاسیولا و تعیین ابعاد احتمالی انگل‌شناسی آن صورت گرفت. برای مطالعه اکولوژی حلزون از سیستم اطلاعات جغرافیایی بر پایه نرم‌افزار Arc GIS و نسخه اولیه‌ای از Arc View استفاده شد. اطلاعات کامپیوتری در این سیستم براساس لایه‌های رقومی (Digital layers) اطلاعات روی هم قرار می‌گیرند و به‌همین دلیل پردازش بصری داده‌ها واضح و پردازش کامپیوتری داده‌ها سریع و دقیق است. یکی از لایه‌های مهم مورد استفاده در مطالعات اقلیم‌شناسی ناقلین، شاخص نرمال شده تفاوت سبزیگی یا NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) Land Sat است. این اطلاعات به‌صورت نقشه از ماهواره‌های به‌دست می‌آید. برای تهیه این نقشه‌ها فرکانس رنگ ساطع شده از زمین طی محاسباتی به عددی بین ۱- برای مناطق کویری تا ۱+ برای جنگل تبدیل می‌شود. هر عدد بیانگر سبزیگی منطقه است که حدود ۱۰۰۰ متر مربع مساحت دارد ولی در کامپیوتر با یک پیکسل نشان داده می‌شود. نرم‌افزارهای تحلیل تصاویر ماهواره ممکن است اعداد فوق را بین ۱ تا ۲۵۶ تبدیل کنند [۱۰].

۲- مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی روی جمعیت حلزون‌های لیمنه پالوستریس استان مازندران، بیش از ۱۸۱ نقطه در سطح استان بررسی شد.

مواد و وسایل مورد استفاده عبارت بودند از پاروی صید حلزون به ابعاد ۲۰×۲۰ سانتی‌متر، دست‌کش، پنس، آب معدنی و آب دکلره، دبه، پتری‌دیش، لام، میکروسکوپ تشریح (لوپ) و میکروسکوپ نوری معمولی و کولیس، GPS، دستگاه pH متر صحرایی، دستگاه کدروت‌سنج (TDScan) صحرایی برای اندازه‌گیری TDS (Total Dissolved Solids) (میزان املاح آب)



شکل ۱ نقشه استان مازندران و پراکندگی کلونی‌های لیمنه پالوستریس براساس تراکم حلزون

مطالعه و تراکم حلزون ارتباط داشت. حاشیه رودخانه‌ها و آبگیرهایی در استان مازندران بررسی شد که فاصله هیچ‌یک از نقاط کمتر از ۱۰۰ متر نبود. شکل ۱ پراکندگی نقاط مورد مطالعه در استان مازندران را نشان می‌دهد.

۲-۱-۳- زمان

عملیات میدانی این مطالعه از سال ۱۳۸۱ تا سال ۱۳۸۳ ادامه داشته است. در هر دوره از مأموریت که بین ساعات ۸ تا ۱۲ صورت گرفت، حلزون‌ها پس از جمع‌آوری در دبه‌های حاوی آب دکلره و یا آب معدنی قرار داده شد. سپس آشغال‌ها و زواندی که همراه حلزون جمع‌آوری می‌شد از آن جدا و دبه‌ها به آزمایشگاه حلزون‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال یافت و در صورتی که بلافاصله امکان شروع عملیات آزمایشگاهی وجود نداشت، در ایستگاه تحقیقاتی بابل با اضافه کردن آب دکلره و کاهو به‌عنوان غذا،

روش کار در مجموع شامل عملیات صحرایی مشتمل بر جمع‌آوری، حمل، نگهداری و عملیات آزمایشگاهی مشتمل بر تصویربرداری و تشخیص، له کردن (Crashing) و ثبت سرکرهای (Cercariae) احتمالی بوده است.

۲-۱-۲- عملیات صحرایی

۲-۱-۱-۲- نوع جمع‌آوری حلزون

با توجه به شرایط اقلیمی و ساختار محیط آبگیرهای منطقه، روش «برحسب نفر» برای جمع‌آوری حلزون استفاده شد [۱۱]. برای این منظور تعداد حلزون جمع‌آوری شده توسط پاروی حلزون‌شناسی تقسیم بر تعداد پارو زدن‌ها شده و متوسط آن به‌دست آمد.

۲-۱-۲- حجم نمونه و مکان

همچون سایر مطالعات حلزون‌شناسی، حجم نمونه با مکان

لایه‌هایی چون شدت سبزی‌نگی، میزان بارندگی در مراکز هواشناسی کشور در محیط نرم‌افزار ArcGIS به آن اضافه شد تا توصیف بهتری از منطقه به دست آید [۱۳]. نقشه‌های NDVI با همکاری دانشگاه والنسیا (Valencia university) اسپانیا از سایت www.NOAA.gov به دست آمد.

۳- نتایج

در بیش از ۱۸۱ سرکشی، در ۱۶۴ نقطه نمونه‌گیری حلزون آب شیرین صید شد. در ۳۶ مورد حلزون لیمنه پالوستریس به تعداد ۴۹۰ عدد یافت و مطالعه شد.

از ۴۹۰ حلزون صید شده در مجموع ۶ حلزون آلوده بوده است (۱/۲۲ درصد). سرکرهای به دست آمده برحسب شکل ظاهری در گروه اکینوستوما سرکریا (*Echinostoma cercaria*) قرار داشتند. در اکینوستوما سرکریا، حلقه‌ای از خار اطراف سرکر را می‌پوشانند. هیچ مورد مشکوک به سرکر فاسیولا مشاهده نشد. برای یافتن میزان واسط دوم ۶۴۲ لیمنه ژدروزیانا (*L. gedrosiana*) و ۱۹۵۸ لیمنه ترونکاتولا (*L. truncatula*) و بیش از هزار حلزون دیگر که اغلب فیزا (*Physa*) و پلانوریس (*Planorbis*) بوده‌اند، بررسی شد اما آثاری از آلودگی آن‌ها و نقش آن‌ها به عنوان میزبان واسط دوم دیده نشد. از آنجا که ممکن بود خود لیمنه پالوستریس به عنوان میزبان واسط دوم اهمیت داشته باشد، این فرضیه هم مورد توجه قرار گرفت اما نگهداری سرکرهای به دست آمده از لیمنه پالوستریس و خوراندن آن به حیوان حساس آزمایشگاهی نیز موفقیت‌آمیز نبود.

بیشترین آلودگی به تعداد ۴ حلزون آلوده در شهرستان نور دیده شد و دو مورد باقی مانده در روستای کردآباد واقع در جاده فیروزکوه مشاهده شد. کلیه یافته‌ها در فصل تابستان بوده است. بیشترین تراکم لیمنه پالوستریس با تعداد ۵۰ حلزون در هر پارو و در شالیزار آب گرفته‌ای در کیلومتر ۶ جاده بابل — آمل و در فصل زمستان دیده شد. اساساً تراکم لیمنه پالوستریس بسته به شرایط اقلیمی، در اواخر زمستان در نواحی پست و آب‌گرفته شمالی استان بیشتر می‌شود و در فصل تابستان در نواحی خنک‌تر کوهستانی بیشتر دیده می‌شود. در کلونی‌های

شرایط زیست حلزون تا اولین فرصت ممکن تسهیل شد. برای پایش جمعیت حلزون ۶ نقطه که به صورت پراکنده در مناطق شرقی، غربی، کوهستانی و کم ارتفاع مناسب برای حضور حلزون دانسته شدند، به مدت ۱۲ ماه مورد سرکشی قرار گرفت. این مراکز عبارت بودند از رودخانه‌های روستاها و شهرهای کردآباد، جویبار، بندپی، بابل، نوشهر، تنکابن. در هر ماه به نقاط فوق سرکشی شده و متوسط تعداد حلزون‌ها و اندازه آن‌ها در هر پارو ثبت شد. برای این منظور حلزون‌ها در گروه‌های ۳-۵، ۶-۸، ۹-۱۱، ۱۲-۱۴ میلی‌متری قرار گرفتند. برای درک بهتر سن حلزون‌ها، پس از اندازه‌گیری حلزون‌ها با کولیس، علاوه بر اندازه و تعداد حلزون‌ها میانگین سنگین تعداد و اندازه حلزون‌ها محاسبه شد. اگر N تعداد حلزون در هر اندازه و V اندازه حلزون باشد و n تعداد کل حلزون‌های صید شده در کلونی باشد، میانگین سنگین $n = ((N1V1)+(N2V2)+...)/n$.

۲-۲- عملیات آزمایشگاهی

در اولین اقدام با استفاده از کلید تشخیص حلزون‌های آب شیرین ایران [۷] جنس و گونه حلزون تشخیص داده شد؛ سپس برای تعیین آلودگی حلزون‌ها [۱۰] از روش له کردن استفاده شد [۱۲]، بدین منظور توسط انبرک پلاستیکی یک عدد حلزون زنده را بین دو لام یا پتری‌دیش قرار داده و با فشار شیشه حلزون را له کرده و توسط میکروسکوپ نوری با لنز ۴، ۱۰ و ۴۰ نسبت به بررسی آلودگی آن اقدام شد؛ در صورت عدم وجود آلودگی حلزون از مطالعه خارج شده و در صورت رویت آلودگی موارد ثبت و اقدامات لازم برای تعیین نوع آلودگی صورت می‌گرفت. از آنجا که این احتمال که خود لیمنه پالوستریس به عنوان میزبان واسط دوم مهم باشد، بسته به نوع احتمالی آلودگی، نمونه‌هایی پس از یک شب برای تشکیل احتمالی متاسرکر (*Metacercaria*) بازبینی یا به حیوان حساس آزمایشگاهی (رت و اردک) خورانده شد.

در پایان با استفاده از نقشه‌های رقومی استان محل صید حلزون‌ها بر سیستم اطلاعات جغرافیایی منتقل شد. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزارهای ArcMap، MS Excel و SPSS و روش‌های آماری توصیفی و ANOVA استفاده شد.

جدول ۳ شیوع لیمنه پالوستریس در فصول مختلف سال بر حسب اندازه (سن)

ماه	۱۲ تا ۱۴ میلی متر	۹ تا ۱۱ میلی متر	۶ تا ۸ میلی متر	۳ تا ۵ میلی متر	جمع
فروردین	۰	۰/۰۶۷	۰/۱	۰/۴۳	۰/۶
اردیبهشت	۰/۱۳۳	۰/۲	۱	۰/۰۳۳	۱/۱۳۷
خرداد	۰	۰/۱۳۳	۰/۶	۰/۱۳۳	۰/۸۶۷
تیر	۰	۰	۰	۰	۰
مرداد	۰	۰/۱	۰	۰	۱/۲
شهریور	۰	۰	۰/۰۵	۰	۰/۰۵
مهر	۰	۰	۰	۰	۰
آبان	۰	۰	۲/۷۲۵	۰/۶۲۵	۳/۳۵
آذر	۰	۰	۰/۷۶۹	۰/۳۸۵	۱/۱۵۴
دی	۰	۰/۱	۰/۳	۰	۰/۴
بهمن	۱	۰	۰	۱	۲
اسفند	۰	۰	۰	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳

حلزون بین درجه دمای آب محیط و تعداد لیمنه پالوستریس صید شده ارتباط آماری معنی داری مشاهده شده است ($p=0/00$). توجه به جدول ۱ نشان می دهد که دمای ۱۵ تا ۱۹ درجه سلسیوس دمای بهینه برای کلونی های حلزون است. همچنین در این مطالعه ارتباط معنی داری بین تعداد حلزون های به دست آمده و میزان املاح آب وجود داشته است ($p=0/00$), بر همین اساس میزان املاح بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ قسمت در میلیون، شرایط مساعد رشد حلزون لیمنه پالوستریس است. ارتباط معنی داری بین pH آب و جمعیت حلزون به دست نیامد. در آنالیز تصویر ماهواره مشاهده شد که متوسط سبزیگی مناطقی که لیمنه پالوستریس دیده شده است، در نیمه اول سال $9/32 \pm 141$ و در نیمه دوم سال $7/33 \pm 136/18$ بوده است.

جدول ۱ وفور کلونی های یافت شده لیمنه پالوستریس در دماهای مختلف آب

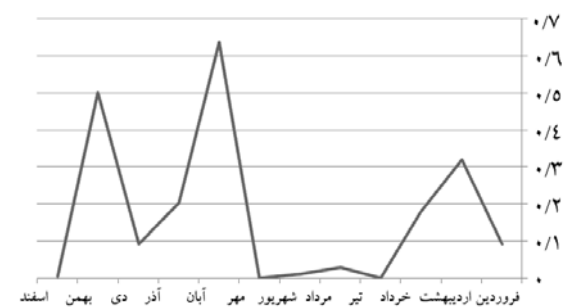
دمای آب (درجه سلسیوس)	تراکم لیمنه پالوستریس		
	کمتر از ۵	۵ تا ۲۵	بیش از ۲۵
کمتر از ۱۵	۱۱	۲	
۱۵/۱ تا ۱۹	۳	۱	۱
۱۹/۱ تا ۲۳	۵		
۲۳/۱ تا ۲۷	۸		
۲۷/۱ تا ۳۱	۳		
بیش از ۳۱	۱		

۴- بحث

مطالعات قبلی در استان مازندران بیانگر وجود لیمنه پالوستریس در استان بوده است. علاوه بر آن در نواحی گسترده ای از استان مرکزی، گیلان، اردبیل، آذربایجان غربی، کرمانشاه، اصفهان و خراسان شمالی نیز یافت می شود [۸]. مطالعات دیگری بیانگر اهمیت حلزون های لیمنه پالوستریس در درمانیت سرکری در استان مازندران است [۱۴].

با وجودی که احتمال یافتن سرکر انواع فاسیولا در لیمنه پالوستریس غیر ممکن نبود [۹] این مطالعه نشانه ای از نقش لیمنه پالوستریس در انتقال انواع فاسیولا در استان مازندران را نشان نداد. وجود اکینوستوما سرکریا بیانگر اهمیت این حلزون در برخی بیماری های دامی در منطقه است و فضا را برای مطالعات تکمیلی باز می کند. این که اکینوستوماها در انتخاب حلزون میزبان واسط خود کمتر اختصاصی عمل می کنند، موجب می شود تا تعیین نوع دقیق کرم با مشکلاتی مواجه شود. چنین به نظر می رسد که هر چند لیمنه پالوستریس در زمستان افزایش جمعیت قابل توجهی می یابد اما کلونی های کم جمعیت و تابستانه آن نقش مهمی در انتقال اکینوستوماهای استان بازی می کند. در مکزیک، کاسترو-ترجو (Castro-Trejo) نشان داده است که لیمنه پالوستریس میزبان واسط پارمفستوموم سروی (*Paramphistomum cervi*) بوده است

پایش جمعیت حلزون نشان داد کلونی های لیمنه پالوستریس در فصل پاییز و زمستان افزایش می یابد، اما سرمای زمستان از تعداد حلزون های بهاره می کاهد. جدول ۳ و شکل ۲ بیانگر وضعیت فوق هستند. باید توجه داشت که کلونی بزرگی که در زمستان یافته شد، ایستگاه بررسی پایش جمعیت نبوده است.



شکل ۲ میانگین سنگین اندازه و تعداد حلزون لیمنه پالوستریس در استان مازندران

استان مازندران مراکز پرورش ماهی به‌طور گسترده‌ای وجود داشته و روز به روز بیشتر توسعه می‌یابند، توجه به نتایج این تحقیق می‌تواند برای پیشگیری احتمالی از بیماری فوق مفید باشد. در صورت لزوم، نتایج این تحقیق می‌تواند راهنمایی برای انتخاب بهترین مکان از لحاظ اقلیمی یا اولویت بخشی مکانی برای تأسیس مزارع تولید اردک و بوقلمون یا مراکز پرورش ماهی باشد.

۵- تشکر و قدردانی

آقای پروفیسور ماریو فونتس (Mario Fuentes) استاد گروه انگل‌شناسی دانشگاه والنسیا در انجام این تحقیق راه‌گشای ما بوده‌اند که بدین‌وسیله از ایشان و تیم تحقیقاتی GIS تشکر می‌گردد، همچنین آقای دکتر ایرج موبدی (Mobedi) استاد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نیز در تشخیص نمونه‌ها مشاور علمی ما بوده است، بدین‌وسیله از همکاری و کرامت ایشان نیز قدردانی می‌شود.

[۱۵]، در فرانسه نیز ژومگار (Goumghar) هاپلومترا سیلیندراکا (*Haplometra cylindrica*) را در لیمنه پالوستریس گزارش کرده است [۱۶]. لیمنه پالوستریس به‌طور کلاسیک میزبان واسط انواع اکینوستوما رولوتوم (*Echinostoma revolutum*) و اکینوپاریفیوم رکورواتوم (*Echinoparyphium recurvatum*) معرفی شده است. هر چند شیوع اکینوستوما رولوتوم در اردک‌های اهلی حدود ۲۷ درصد و در بوقلمون حدود ۲ درصد اعلام شده است [۱۷]، اطلاعاتی در مورد نقش حلزون میزبان واسط این انگل‌ها در انتقال بیماری در ایران موجود نیست. عمده محدودیت و مانع بر سر راه این تحقیق، شرایط آب و هوایی سخت برای عملیات صحرایی و عدم رشد سرکرهای به‌دست آمده در حیوانات آزمایشگاهی برای تعیین دقیق نوع انگل بود و این مطالعه می‌تواند به روشن شدن چرخه زندگی این انگل‌ها در استان مازندران کمک کند. از آن‌جا که دیپلوستوموم اسپاتاکوم (*Diplostomum spathaceum*) که فلوک چشم (Eye fluke) نامیده می‌شود نیز از همین حلزون برای تکمیل سیر تکاملی خود استفاده می‌کند [۱۸] و از سویی در

۶- منابع

- [1] Malek EA. Snail-Transmitted parasitic disease. Boca Raton, Florida: CRC, 1980; p: 252.
- [2] Schistosomiasis. World Health Organization; 2008 Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.
- [3] Mas-Coma S, Bargues MD. Human Fascioliasis. In: Dalton J, editor. Fascioliasis. Dublin city University, Republic of Ireland: CAB International, 1999; p: 411-33.
- [4] Massoud J. Present status of Fascioliasis in Iran: Wld Hlth Org. Mimeogr Rep. 1993; SCH/SG/93/WP 19.
- [5] Kejbafzadeh AM, Hoghooghi-Rad N, Shenyari I, Nemat R. Progress in urinary schistosomiasis control measures in Iran. J Trop Med Hyg 1995; 98(2): 131-5.
- [6] Zamini Gh, Massoud J. Distribution and Trematodes larval contamination of *Bulinus truncatus*. J Ghazvin Univ Med Sci 1999; 10: 50-6.
- [7] Mansoorian A. Study on funa of fesh water snails in Iran. Presented for the Ph.D., Tehran, Tehran University of Medical Sciences, 1993. (Persian)
- [8] Mansoorian A, Rokni MB. Medical Malacology. Tebesh Andisheh, Tehran, 2003; p: 57-68.
- [9] Dreyfuss G, Moukrim A, Rondelaud D, Vareille-Morel C. Field observations concerning infection of *Lymnaea palustris* by *Fasciola hepatica*. J Helminthol 1994; 68(2): 115-8.
- [10] What is NDVI. 2009 Available from: <http://www.csc.noaa.gov/crs/definitions/NDVI.html>.

- [11] Olivier L, Schneiderman M. A Method for estimating the density of aquatic snail populations. *Exp Parasitol* 1956;5(2): 109-17.
- [12] Malek EA. Laboratory Guide and Notes for Medical Malacology. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1962; p: 106.
- [13] Fuentes MV, Sainz-Elipe S, Nieto P, Malone JB, Mas-Coma S. Geographical Information Systems risk assessment models for zoonotic fascioliasis in the South American Andes region. *Parassitologia* 2005; 47(1): 151-6.
- [14] Athari A, Gohar-Dehi S, Rostami-Jalilian M. Determination of definitive and intermediate hosts of cercarial dermatitis-producing agents in northern Iran. *Arch Iran Med* 2006; 9(1): 11-5.
- [15] Castro-Trejo L, Garcia-Vasquez Z, Casildo-Nieto J. The susceptibility of Lymnaeid snails to *Paramphistomum cervi* infections in Mexico. *Vet Parasitol* 1990; 35(1-2): 157-61.
- [16] Goumghar MD, Abrous M, Ferdonnet D, Dreyfuss G, Rondelaud D. Prevalence of *Haplometra cylindracea* infection in three species of *Lymnaea* snails in central France. *Parasitol Res* 2000; 86(4): 337-9.
- [17] Eslami A. Trematoda. *Veterinary Helminthology*. Tehran University, Tehran, 1990; p: 144. (Persian)
- [18] Palmieri JR, Heckmann RA, Evans RS. Life history and habitat analysis of the eye fluke *Diplostomum spathaceum* (trematoda: diplostomatidae) in Utah. *J Parasitol* 1977; 63(3): 427-9.

کلونینگ و توالی‌یابی ژن GRA7 (Granular Antigen7) توکسوپلازما گوندهای

فاطمه غفاری فر^{۱*}، رحمة نوردین^۲، زهره شریفی^۲، عبدالحسین دلیمی^۳، شهلا رودبارمحمدی^۴، سکینه قاسمی نیکو^۵

- ۱- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه USM، پنانگ، مالزی
- ۳- استادیار، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استادیار، گروه فارچ‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۶- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۱۱

چکیده

هدف: توکسوپلازما گوندهای تک یاخته‌ای داخل سلولی و عامل ایجاد توکسوپلاسموزیس بوده و دارای انتشار جهانی است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه تهیه واکسن صورت گرفته که منجر به ایجاد پاسخ‌های محافظت‌کننده شده است. آنتی‌ژن GRA7 با وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون یک آنتی‌ژن ترشحی گرانولی فشرده است که به وسیله سلول‌های آلوده میزبان آزاد می‌شود. در سلول‌های آلوده به تاکیزوئیت، پروتئین ۲۹ کیلو دالتونی در واکوئل پارازیتوفروز تجمع پیدا می‌کند. علاوه بر ایمونوژن بودن و کاندیدای تهیه واکسن در تشخیص نیز به‌کار می‌رود.

مواد و روش‌ها: برای این کار ابتدا DNA توکسوپلازما گوندهای با روش فنل کلروفرم استخراج شده سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن GRA7 این قطعه با استفاده از PCR تکثیر و در ناقل TOPO کلون شد. پلاسمید کلون شده در باکتری TOP10 ترانسفورم شد. با استفاده از PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی کلون مورد نظر تأیید شد.

نتایج: تعیین توالی ژن GRA7 کلون شده در پلاسمید TOPO نشان داد که قطعه‌ای ۷۴۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و با سویه RH موجود در بانک ژنی از نظر توالی نوکلئوتیدی فقط در یک باز تفاوت داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که کلون به‌دست آمده برای ساب‌کلون کردن در پلاسمیدهای بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی مناسب است.

کلیدواژگان: توکسوپلازما گوندهای، ژن GRA7، کلونینگ، توالی‌یابی

۱- مقدمه

مادرزادی و سقط جنین در انسان و حیوانات اهلی دارای اهمیت پزشکی و دامپزشکی است [۱، ۲]. توکسوپلاسموزیس آثار متفاوتی در میزبان ایجاد می‌کند. در افراد دچار

توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) توسط تک‌یاخته‌ای انگلی به نام توکسوپلازما گوندهای (*Toxoplasma gondii*) ایجاد می‌شود و گسترش جهانی دارد. این بیماری به علت عفونت

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱

Email: ghafarif@modares.ac.ir

ضعف سیستم ایمنی مثل افراد مبتلا به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)، گیرنده‌های پیوند عضو و بیماران سرطانی باعث بیماری‌های شدید و مرگ و میر می‌شود [۳]. درمان این بیماری به‌خاطر آثار سمی داروهای در دسترس مشکل است. تحت شرایط حاضر ایجاد و گسترش داروهای جدید ضد توکسوپلازما یا یک واکسن، جایگزین بسیار مناسبی خواهد بود [۳].

تاکنون در ایران در مورد تهیه واکسن بر علیه توکسوپلازما سموزیس تحقیقاتی انجام شده است، در سال ۱۹۸۰ محمودی (Mahmoudi) و قربانی (Ghorbani) در دانشکده بهداشت دانشگاه تهران اثر محافظت کنندگی توکسوپلازما سویه جدا شده از انسان در ایران (سویه تهران) را در برابر سویه RH در موش سفید کوچک آزمایشگاهی بررسی کردند [۴].

در سال ۲۰۰۰ دریانی (Daryani) و همکاران پاسخ‌های ایمنی سلولی فراکشن‌های حاصل از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی تاکی‌زوئیت (Tachyzoite) توکسوپلازما گونه‌ای را در مدل موشی مطالعه کردند [۵].

در سال‌های اخیر، تکنولوژی پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خوبی را برای توسعه و ایجاد واکسن‌های چندظرفیتی ارائه کرده است [۶]. واکسیناسیون DNA بحث کاملاً جدیدی است و روش قدرتمندی برای القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کد شده را بیان می‌کنند [۳]. در سال ۲۰۰۷ صلح‌جو (Solhjoo) و همکاران واکسن DNA را با استفاده از ژن SAG1 برای ایمن‌سازی در موش علیه توکسوپلازما گونه‌ای انجام دادند که میزان بقای موش‌های ایمن شده بیش از موش‌های گروه شاهد بود و این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود [۷]. واکسیناسیون ژنی پاسخ‌های ایمنی مؤثر و طولانی مدتی القاء می‌کنند. پروتئین‌های ترشحی اولین بار به‌عنوان آنتی‌ژن‌های مترشح توصیف شدند زیرا وقتی انگل با سرم انکوبه می‌شود این مواد ترشح می‌شوند [۸]. آنتی‌ژن‌های گرانولی یا GRA (Granular antigen) از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی هستند که

این آنتی‌ژن‌ها به‌وسیله تاکی‌زوئیت‌ها و برادی‌زوئیت‌ها (Bradyzoites) بیان می‌شوند [۶]. از اعضای آنتی‌ژن‌های گرانولی، GRA4 (۴۰ کیلودالتون) GRA1 (۲۳ کیلودالتون) GRA7 (۲۹ کیلودالتون) به‌عنوان گزینه‌های واکسن شناخته شده‌اند [۹].

آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلازما گونه‌ای از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های به‌کار رفته هم در زمینه واکسن و هم در زمینه تشخیص هستند. از میان آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی، آنتی‌ژن‌های گرانولی فشرده از اهمیت خاصی برخوردارند. در این میان آنتی‌ژن گرانولی شماره ۷ یا GRA7 از جمله آنتی‌ژن‌های مهمی محسوب می‌شوند که هم در زمینه تشخیص و هم ایمنی‌زایی به‌کار برده می‌شوند.

ژن GRA7 پروتئین ۲۹ کیلودالتونی را کد می‌کند که این پروتئین توسط سلول‌های میزبان این انگل ترشح می‌شود. در سلول‌های آلوده به تاکی‌زوئیت‌ها تجمع این پروتئین در واکوئل پارازیتوفروز (Parasitophorous vacuole) صورت می‌گیرد. در سلول‌های آلوده به برادی‌زوئیت‌ها در سیتوپلاسم سلولی حضور دارد و به‌وسیله روش ایمونوفلورسانس قابل شناسایی است. به‌علاوه در محیط‌های کشت سلولی حاوی کیست که فاقد انگل خارج سلولی هستند، در محلول رویی این محیط‌های کشت سلولی پروتئین ۲۹ کیلودالتونی با استفاده از روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) قابل شناسایی است. از طرف دیگر این آنتی‌ژن با وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون بسیار ایمونوژن بوده و یکی از کاندیداهای تهیه واکسن است. هدف از این کار آماده‌سازی ژن GRA7 در پلاسمید ناقل برای ساب‌کلونینگ در پلاسمیدهای یوکاریوت و پروکاریوت است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلازما

گونه‌ای

تاکی‌زوئیت‌های این انگل با پاساژ (Passage) متوالی داخل صفاقی در موش‌های سوری نگهداری و تکثیر

آغازگر جلویی دارای ۲۶ نوکلئوتید و شامل جایگاه شناسایی برش آنزیمی BamH1 است و آغازگر برگشتی دارای ۲۸ نوکلئوتید و شامل جایگاه شناسایی برش آنزیمی Kpn1 است. آغازگر جلویی برابر با توالی نوکلئوتیدهای شماره ۷۰ تا ۸۶ ژن GRA7 و آغازگر برگشتی برابر با توالی نوکلئوتیدهای شماره ۷۸۲ تا ۸۰۰ ژن GRA7 است.

محصول واکنش PCR در ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که شامل ترکیبات زیر است: ۲ میکروگرم DNA استخراج شده، ۲/۵ میلی مولار، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۱ میکرولیتر DNA پلیمرز *Taq* (*Taq* DNA polymerase) (۰/۵ واحد)، ۱۱/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرها (۱۰ پیکومول در میکرولیتر).

مواد فوق درون ویال ریخته شد و پس از اسپین (Spin) در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد و طبق برنامه زیر PCR انجام شد: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، واسرشتگی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال (Annealing) ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، بسط (Extension) ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد؛ سه مرحله اخیر ۵ چرخه تکرار شد، سپس واسرشتگی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، بسط ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد. سه مرحله اخیر ۳۰ چرخه و در نهایت واکنش PCR با بسط نهایی ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتی گراد به اتمام رسید.

۵-۲- کلونینگ ژن GRA7 در پلاسمید TOPO

در این تحقیق به منظور کلونینگ ژن GRA7 از کیت کلونینگ استفاده شد (شامل: پلاسمید TOPO که به صورت بریده شده درون کیت موجود است (Invitrogen)، مخلوطی از ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۰/۵ میکرولیتر محلول نمک (salt solution) و ۰/۵ میکرولیتر ناقل TOPO با هم مخلوط و در دمای اتاق انکوبه شد.

می شوند. برای این منظور به هر موش ۰/۵ سی سی مایع صفاقی حاوی 2×10^6 تاکی زوئیت زنده به طور داخل صفاقی تلقیح شد و پس از گذشت ۴ الی ۵ روز، مایع صفاقی موش های آلوده به وسیله سرنگ های ۵ سی سی یا ۱۰ سی سی جمع آوری شد [۱۰].

۲-۲- استخراج DNA (DNA Extraction)

۱۰۰ میکرولیتر (در حدود 5×10^7) از تاکی زوئیت های تغلیظ شده و شستشو شده با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) درون یک ویال ۱/۵ سی سی ریخته شد و با روش فنل کلروفرم DNA آن استخراج شد. DNA استخراج شده تا مرحله بعد در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۱].

۳-۲- اندازه گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن

تعیین غلظت DNA به وسیله اسپکتروفتومتری با جذب نور ماوراء بنفش به طور دقیق انجام می شود. به طور معمول جذب در ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری می شود که در این طول موج جذب برابر با یک، معادل ۵۰ میکروگرم DNA دو رشته ای در یک میلی لیتر است [۱۱، ۱۲].

۴-۲- طراحی آغازگرها (Primers)

به منظور طراحی آغازگرهای جلویی (Forward) و برگشتی (Reverse)، ابتدا توالی DNA ژن کدکننده GRA7 از اطلاعات بانک ژنی از سایت اینترنتی <http://www.ncbi.com> به صورت 'Compelet cds: 839 bp, RH strain' با شماره Y13863 جمع آوری شد، سپس با استفاده از این اطلاعات و به کمک نرم افزار GenRuner، جفت آغازگرها به صورت زیر طراحی شدند:

F: 5'-gcc-gga-tcc- att-tcc-aaa-atg- gcc-cg-3'
BamH1 (جفت باز)
R: 5'-ctt-ggt-acc-gcc-ccc-ata-tcc-tac-tgg-c-3'
Kpn (جفت باز)

در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کلونی‌های آبی یا سفید ظاهر شود [۱۱].

۲-۸- استخراج پلاسمید از کلونی‌های آبی و سفید

استخراج پلاسمید از کلون‌های سفید و آبی مطابق دستورالعمل گفته در کیت استخراج پلاسمید شرکت بیونر (Bioneer) آلمان انجام شد.

۲-۹- مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از

کلونی‌های آبی و سفید

پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های سفید (به‌علت وجود قطعه کلون شده در آن) سنگین‌تر از پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های آبی هستند؛ برای این منظور پلاسمیدهای استخراج شده از پلاسمیدهای کلونی‌های آبی و سفید روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نمونه‌گذاری و مقایسه شدند [۱۱].

۲-۱۰- انجام روش PCR برای تأیید و انتخاب

کلونی‌های مناسب

از ۲۰ کلونی سفید و ۲ کلونی آبی نمونه تهیه شد؛ بدین ترتیب که با سمپلر مقداری از این کلونی‌ها در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد و ۲ دقیقه جوشانده شد. سپس از این جوشانده ۲ میکرولیتر به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد و از آغازگرهای FM13 و R نیز برای واکنش PCR استفاده شد.

۲-۱۱- تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing)

به‌منظور تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید TOPO، ابتدا پلاسمیدهای موجود در باکتری‌های کلونی سفید به‌منظور پیشگیری از هر گونه آلودگی، توسط کیت شرکت بیونر (Bioneer) آلمان مطابق با دستور کار شرکت سازنده کیت استخراج شد و برای تعیین توالی ارسال شد. سپس نتیجه تعیین

۲-۶- انتقال پلاسمید کلون شده به باکتری

TOP10 (Transformation)

باکتری مستعد را از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج کرده و به‌مدت نیم ساعت درون ظرف یخ گذاشته شد تا به دمای صفر درجه سانتی‌گراد برسد و سپس کل محصول کلونینگ را به آن اضافه می‌کنیم، این مجموعه را بدون استفاده از ورتکس (Vortex) و به آرامی با هم مخلوط می‌کنیم و ۲۰ دقیقه در یخ انکوبه می‌کنیم. سپس به‌مدت ۴۰ ثانیه در بن‌ماری ۴۲ درجه قرار می‌دهیم سپس دوباره ۲ دقیقه در یخ قرار می‌دهیم. مقدار ۳۵۰ میکرولیتر از محیط LB (Luria Bertani) مایع بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به‌مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور شیکردار (Shaker incubator) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

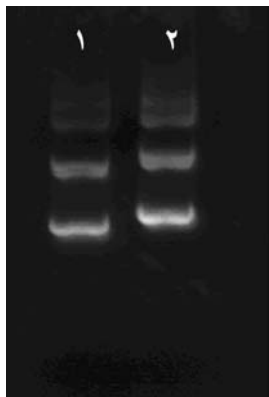
۲-۷- غربال کردن (Screening) کلون‌های

باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب

پس از انتقال DNA نو ترکیب به درون سلول میزبان لازم است که کلون‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب مناسب، غربال و انتخاب شوند.

اگر X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) همراه با یک القاء کننده آنزیم یعنی ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوسید (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) و آمپی‌سیلین به آگار اضافه شود، کلونی‌های فاقد پلاسمید نو ترکیب که در آن‌ها بتا‌گالاکتوزیداز سنتز می‌شود و X-gal را تجزیه می‌کند و ایندولیل تولید می‌شود که رنگ آن آبی است و کلونی باکتری میزبان را آبی رنگ می‌کند. در حالی‌که کلونی‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب چون قادر به ساخت بتا‌گالاکتوزیداز نیستند نمی‌توانند X-gal را تجزیه کنند، بنابراین کلونی آن‌ها به رنگ سفید خواهند بود. در زیر هود و شرایط استریل، مقدار ۱۰۰-۲۰۰ میکرولیتر سلول‌های ترانسفورم شده به یک پلیت حاوی X-gal، IPTG اضافه و به کمک میله شیشه‌ای در تمام نقاط پلیت پخش شد. پلیت‌ها به‌صورت وارونه به‌مدت یک شب (۱۶-۱۸ ساعت) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به‌مدت چند ساعت

کرده‌اند و پلاسمیدهای نو ترکیب TOPO-GRA7 تشکیل شده‌اند. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی (TOPO) و کلونی‌های سفید (TOPO-GRA7) بعد از واکنش اتصال نشان داد که هر دو پلاسمید روی ژل آگارز سه باند دارند که به ترتیب از بالا به پایین عبارتند از حلقوی باز (Open Circular)، خطی (Linear) و سوپرکویل (Super coil) به طوری که در آن باندهای پلاسمید TOPO-GRA7 در مقایسه با باندهای استخراج شده از کلونی‌های آبی (TOPO) روی ژل آگارز بالاتر قرار داشتند. بنابراین پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی سفید از پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی سنگین‌تر هستند (شکل ۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که قطعه GRA7 در پلاسمید TOPO کلون شده است. پس از تأیید کلون نو ترکیب، از کلونی مربوط کشت داده شد و پلاسمیدها استخراج شد (شکل ۳).



شکل ۲ مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید (سمت راست) و کلونی‌های آبی (سمت چپ)



شکل ۳ الکتروفورز محصول PCR coloni روی ژل آگارز؛ ستون ۱: نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی؛ ستون‌های ۲-۶: محصول PCR به دست آمده از کلونی‌های شماره ۶، ۱۲، ۱۴، ۱۶ و ۱۷ حاوی پلاسمید نو ترکیب

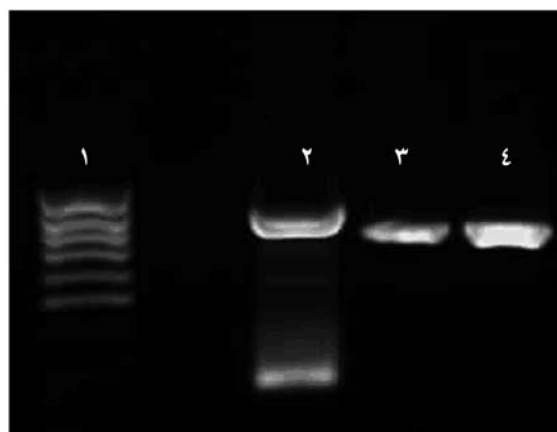
توالی ژن کلون شده به کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تشابهات و اختلافات با ژن GRA7 توکسوپلازما گونه‌ای مقایسه شد.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج PCR به کمک DNA ژنومی

شکل ۱ نشان داد که تحت شرایط مذکور واکنش PCR فقط یک باند حدوداً ۷۴۹ جفت‌بازی روی ژل الکتروفورز ایجاد شده است که هم اندازه ژن GRA7 توکسوپلازما گونه‌ای است و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده است. بنابراین شرایط تنظیم شده و آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن GRA7 اختصاصی هستند.

نتایج PCR با استفاده از آغازگرهای یونیورسال (Universal) قطعه ۹۵۰ بازی را نشان می‌دهد.



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز؛ ستون ۱: نشانگر (Marker) ۱۰۰ جفت‌بازی؛ ستون ۲: محصول PCR به دست آمده از ژن SAG1 (به عنوان کنترل مثبت)؛ ستون‌های ۳ و ۴: محصول PCR ژن GRA7

۳-۲- نتایج ترانسفورماسیون باکتری‌ها با

محصول واکنش اتصال

ظهور کلونی‌های سفید و آبی روی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و آغشته به X-gal و IPTG نشان‌دهنده ترانسفورماسیون موفق بود. به طوری که بیش از ۹۵ درصد کلونی‌ها را نوع سفید تشکیل می‌داد. وجود کلونی‌های سفید نشان داد که پلاسمیدهای TOPO قطعه ژنی حاصل از PCR را دریافت

Tgatgattgaagttaccctatatgtgggcttgtaacgtttgtattaaaggga
ttactgcggcgtctcatttccaaatggcccgaca(g)cgcaatttttccgcg
ctttgtgttttagcctgtggtgcggcgtttgccccagttcgtaccgcggc
caccgcgtcagatgacgaactgatgagtcgaatccgaaattctgacttttcg
atggtcaagcaccggttgacagctctcagaccgacgaacgccggtgctgact
cgaaaggacggacgatcacctaccaccagcatggataaggcatctgtga
gagagtcagcttccgagaagagagccattggagacggagccagatgaac
aagaagaagttcatttcaggaagcaggcggtccgttccgacgctgaagtga
ctgacgacaacatctacgaggagcacactgatcgttaagtggttccgaggga
agtcggagggaagcgaagcttcaaagacttgctgaagaagctcgcgctg
ccggtgtgtgtatgggtgcatctgtatttgcgctgatagactgtgcccga
actaacagaggagcaacagagaggcgacgaaccctaacaccggcca
gaatgtgggactgtgttaggtctgcagcgcttgcgtgctgcccgcgcttc
cttggcatgggtctcagaggacgtaccgacattttcccccacgaaaaaca
gatcacggcagcctgactcagcaagaggtgcctgaatcaggcgaagat
ggggagggatcccgcagtaggatatgggggctaataaaagttagtagg
agctcgaggacagtgtcccgaa

شکل ۵ نتیجه توالی به دست آمده از تعیین توالی ژن GRA7 که تنها در یک جایگاه باز a تبدیل به g شده است، یعنی توالی سه تایی cga تبدیل به cgg شده که هر دو توالی اسید آمینه آرژنین را کد می‌کنند. جایگاه آغازگرها روی ژن مشخص شده است.

۴- بحث

توکسوپلاسموزیس از عفونت‌های شایع انسان است. عفونت طی دوره بارداری می‌تواند منجر به توکسوپلاسموزیس مادرزادی شود که میزان عفونت و ابتلای جنین بستگی به دوره بارداری دارد که مادر در آن دوره به این عفونت مبتلا می‌شود. عفونت در سه ماه اول منجر به عوارض خطیر می‌شود [۲].

اخیراً مشاهده شده است که توکسوپلاسموزیس در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند مثل افراد مبتلا به AIDS یا بیماران نئوپلاستیک (Neoplastic) یا افرادی که پیوند قلب یا مغز استخوان داشته‌اند کشنده است [۲]. بنابراین تشخیص به موقع بیماری در این افراد می‌تواند حیاتی باشد.

پروتئین‌های GRA اولین بار به عنوان آنتی‌ژن‌های مترشحه توصیف شدند زیرا وقتی انگل با سرم انکوبه می‌شود این مواد ترشح می‌شوند [۵، ۸]. این آنتی‌ژن‌ها به وسیله تاکیزوئیت‌ها و برادی‌زوئیت‌ها بیان می‌شوند [۶]. از اعضای آنتی‌ژن‌های دفعی ترشی مولکول‌های GRA هستند. GRA4 (۴۰ کیلودالتون) GRA1 (۲۳ کیلودالتون) GRA7 (۲۹ کیلودالتون) به عنوان گزینه‌های واکسن شناخته شده‌اند [۶، ۱۳، ۱۴].

آنتی‌ژن‌های دفعی ترشی توکسوپلاسمای گونه‌ای از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های به کار رفته هم در زمینه واکسن و هم در زمینه تشخیص

۳-۳- نتایج PCR قطعه GRA7 با استفاده از

پلاسمید نو ترکیب TOPO-GRA7 به عنوان الگو

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR با پلاسمید نو ترکیب TOPO-GRA7 با استفاده از آغازگرهای یونیورسال در شکل ۴ نشان داده شده است و گویای این است که ژن GRA7 در پلاسمید TOPO کلون شده است.



شکل ۴ نتایج به دست آمده از PCR پلاسمید حاوی ژن GRA7؛ از طرف چپ ستون ۱: نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی؛ ستون‌های ۲ و ۳: محصول PCR ژن GRA7 به دست آمده از محصول PCR با استفاده از آغازگرهای یونیورسال است که با استفاده از این آغازگر قطعه تکثیر شده ۹۵۰ جفت‌بازی است.

۳-۴- نتایج تعیین توالی

پس از بررسی و مقایسه نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده در پلاسمید TOPO با ژن GRA7 توکسوپلاسمای گونه‌ای به کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast مشخص شد که قطعه‌ای ۷۴۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن GRA7 توکسوپلاسمای گونه‌ای است (شکل ۱)؛ به طوری که با سویه RH (AY21778401.1) از نظر توالی نوکلئوتیدی فقط در یک باز تفاوت دارد و باز a تبدیل به باز g شده است.

GRA7 را به جز در یک باز دارد که باز a تبدیل به باز g شده است. در توالی سه تایی CGA تبدیل به CGG شده که این تفاوت باز روی نوع اسید آمینه کد شونده تأثیر ندارد و هر دو توالی اسید آمینه آرژینین را کد می‌کنند، بنابراین کلون انجام شده قادر است دقیقاً همان ژن GRA7 با همان اسیدهای آمینه را در پلاسمیدهای مناسب بیان کند. پلاسمید نو ترکیب TOPO-GRA7 می‌تواند چندین کاربرد داشته باشد؛ اولاً این که با سایت‌های آنزیمی طراحی شده در آغازگرها این ژن مناسب کلون شدن در پلاسمید بیانی یوکاریوتی pCDNA3 بوده بنابراین با ساب کلون کردن آن در این پلاسمید برای تهیه واکسن DNA مناسب می‌شود و همچنین با توجه به موقعیت کدون شروع کننده ATG در پلاسمید نو ترکیب TOPO-GRA7 مناسب برای ساب کلون کردن این ژن در پلاسمید پروکاریوتی pROXT(b) برای تولید آنتی ژن نو ترکیب در باکتری است و آنتی ژن تهیه شده برای تشخیص این بیماری مناسب خواهد بود.

۵- تشکر و قدردانی

در این تحقیق جا دارد که از کلیه کسانی که اینجانب را یاری نموده‌اند کمال تشکر و تقدیر را به عمل آورم، به خصوص از آقای دکتر فتح الهی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که زمینه را برای مأموریت تحقیقاتی اینجانب فراهم نمودند و همچنین آقای دکتر صدرایی مدیر محترم گروه انگل شناسی، خانم دکتر اسماء اسماعیل ریاست محترم انستیتو تحقیقاتی پزشکی مولکولی مالزی و خانم گیتا سعادت‌نیا دانشجوی دکتری انستیتو تحقیقاتی پزشکی مولکولی مالزی.

هستند. از میان آنتی ژن‌های دفعی ترشحی آنتی ژن‌های گرانولی فشرده از اهمیت خاصی برخوردارند. در این میان آنتی ژن گرانولی شماره ۷ یا GRA7 از جمله آنتی ژن‌های مهمی محسوب می‌شوند که مخصوصاً در زمینه تشخیص به کار برده می‌شوند. ژن GRA7 پروتئین ۲۹ کیلودالتونی را کد می‌کند که این پروتئین توسط سلول‌های میزبان این انگل ترشح می‌شود [۱۴].

پروتئین ۲۹ کیلودالتونی (GRA7) وقتی همراه با پروتئین‌های ۳۰ و ۳۵ کیلودالتونی به کار رود برای شناسایی موارد IgG مثبت به کار می‌رود و این پروتئین وقتی به همراه پروتئین‌های ۳۵ و ۶۶ به کار برده می‌شود برای تشخیص موارد IgM مثبت به کار می‌رود [۱۵، ۱۶].

ژن GRA7 برای تهیه آنتی ژن نو ترکیب برای تشخیص از کاندیداهای اصلی در تشخیص توکسوپلاسموزیس به کار می‌رود. استفاده از این آنتی ژن برای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس به خصوص در موارد خطرناک کشنده در بیماران ایدزی و توکسوپلاسموزیس مادرزادی بسیار اهمیت دارد [۱۵].

همچنین به کارگیری این ژن برای تهیه واکسن نیز از موارد مهم برای تحریک سیستم ایمنی میزبان برای مقابله با بیماری توکسوپلاسموزیس است.

در سال ۲۰۰۸ ژانگرت (Jongert) و همکاران نیز با انجام واکسیناسیون با پلاسمید حاوی ژن GRA7 در موش آن را در کاهش تولید کیست در مغز مؤثر دانست و تا ۲۴ درصد باعث کاهش کیست‌ها شده بود [۱۷].

در این تحقیق ژن کلون شده تمامی توالی بازهای ژن

۶- منابع

- [1] Darde ML, Ajzenberg D, smith J. Population Structure and Epidemiology of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss M, Kim K, (Eds). *Toxoplasma gondii*. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. 1st ed. Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2007; p: 49-80.
- [2] Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1988; p: 220.
- [3] Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect* 2003; 5(5): 457-62.
- [4] Mahmoudi Majid. Evaluation the effect of *Toxoplasma* isolated from human in Iran

- against RH strain in mice. Presented for the M.Sc., Tehran, Tehran Medical Sciences University, 1980. (Persian)
- [5] Daryani Ahmad. Immune cellular responses to fractionate excretory secretory antigens of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in mice. Presented for the Ph D., Tehran, Tarbiat Modares University, 2000. (Persian)
- [6] Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol* 2001; 100(1-2): 3-12.
- [7] Solhjoo K, Ghaffarifar F, Dalimi Asl A, Sharifi Z. Enhancement of Antibody immune response to a *Toxoplasma gondii* SAG1 encoded DNA vaccine by formulation with Aluminium Phosphate. *J Med Sci* 2006; 7(3): 361-7.
- [8] Nigro M, Gutierrez A, Hoffer AM, Clemente M, Kaufer F, Carral L, Martin V, Guarnera EA, Angel SO. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired Toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47(4): 609-13.
- [9] Schaap D, Vermeulen AN, Roberts CW, Alexander J. Vaccination against Toxoplasmosis: current status and future prospects. In: Weiss M, Kim K, (Eds). *Toxoplasma gondii. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. 1st Ed, Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2007; p: 721-62.
- [10] Johnson JD, Holliman RE. Toxoplasmosis. In: Gillespie SH, Hawkey PM. *Medical Parasitology: A practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, 1995; p:33-60.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second Edition, Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] Nucleic acid isolation and purification manual Roch. *Molecular Biochemicals*. 1998.
- [13] Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 Protein Is Protective against congenital Toxoplasmosis in BALB/c Mice but Not in CBA/J Mice. *Infect Immun* 2003; 71(11): 6615-9.
- [14] Lebrun M, Carruthers VB, Cesbron-Delaue MF. *Toxoplasma* secretory proteins and their roles in cell invasion and intra cellular survival. In: Weiss M, Kim K (Eds). *Toxoplasma gondii. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. 1st Ed, Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2007; p: 265-316.
- [15] Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM. Recombinant Antigens To Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3): 1144-50.
- [16] Fachado A, Rodriguez A, Angel SO, Pinto DC, Vila I, Acosta A, Amendoeira RR, Lannes-Vieira J. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal Toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 2003; 21(13-14): 1327-35.
- [17] Jongert E, Verhelst D, Abady M, Petersen E, Gargano N. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein-protein vaccine combination but not by its DNA-protein counterpart. *Vaccine* 2008; 26: 5289-95.

