





# بسم الله الرحمن الرحيم

## مجله علوم پزشکی مدرس

### فصلنامه پژوهشی

دانشکده علوم پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس

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

### فهرست مقالات

- تغییرات بیان ایستگرین های  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha 4$  و  $\beta 3$  و لیگاند آنها استئوپوتین در مراحل مختلف چرخه استروس موش ..... ۱  
فاطمه پیغمبری، مژده صالح‌نیا، مجتبی رضازاده‌لوجردی، مهدی فروزنده
- بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا بر پیشبرد چرخه سلولی در یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی ..... ۹  
امیر ثابت‌سرستانی، پرویز عبدالمالکی، سید جواد مولی، فائزه قناتی، زینب توسلی، عمران حشمتی
- کلوبنینگ و توالی‌یابی ژن **Leishmania homologue of receptors for activated C kinase (LACK)** ..... ۱۹  
لیشمانیا ماژور سویه استاندارد ایرانی ..... ۱۹  
اوغل نیاز جرجانی، فاطمه غفاری‌فر، زهره شریفی، عبدالحسین دلیمی، زهیر محمد حسن
- تشخیص حذف‌های ناشناخته ژن‌های آلفا-گلوبین در ناقلين 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 نوکلتوتیدی در پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در دو سال متولی در شهرستان چابهار ..... ۴۱  
عبدالحسین دلیمی، فاطمه جالوسیان، سیامک میراب‌سمیعی، فاطمه غفاری‌فر، فرامرز سلیمانلو، رامین نقی‌زاده
- مهار ژن **K562** در رده سلولی **cAMP response element binding protein siRNA** ..... ۴۹  
زهرا دیلمی خیابانی، مهدی بنان، علی‌محمد اصغریان، جلال قره‌سوران، حسین نجم‌آبادی
- راه اندازی آزمایش الایزا برای تعیین عیار آنتی‌بادی ضد ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک و مقایسه نتایج با روش ختنی‌سازی 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 محوری، غلام‌رضا مولوی، اسدالله حسینی‌چگینی، جعفر مسعود
- کلوبنینگ و توالی‌یابی ژن **GRA7 (Granular Antigen7)** توکسوپلاسمای گوندهای ..... 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 مونوستیوژنر بر سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ لنفویتی‌های کمکی نوع ۱ ..... ۸۷  
معصومه معتمدی، سمانه عرب، معصومه خمیس‌آبادی، زهراء غفلتی، جمشید حاجتی
- بیانیه ..... ۹۷
- برگه اشتراک ..... ۹۹
- چکیده مقالات به زبان انگلیسی ..... ۱۱۲

## تغییرات بیان اینتگرین‌های $\alpha 4$ , $\beta 1$ , $\alpha v$ , $\beta 3$ و لیگاند آن‌ها استئوپونتین در مراحل مختلف چرخه استروس موش

فاطمه پیغمبری<sup>۱</sup>, مژده صالح‌نیا<sup>۲\*</sup>, مجتبی رضازاده‌لوجردی<sup>۳</sup>, مهدی فروزنده<sup>۴</sup>

- 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

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۵  
پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۱۲

### 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 اندومنتر 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 متنقل شده و برش‌هایی به ضخامت  $-8$  میکرون از آن‌ها تهیه شد. این لام‌ها برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی و ارزیابی بروز اینتگرین‌های  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 3$  و لیگاند آن‌ها استئوپونتین به کار گرفته شدند.

**نتایج:** مطابق بافت‌ها بیان مولکول‌های اینتگرین در اندومنتر موش تنها در مرحله متاستروس مثبت بود و در مکان‌های متفاوتی از اندومنتر بیان شد. اینتگرین  $\alpha v$  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 استرومایا ملاحظه شد. استئوپونتین فقط در غشای رأسی هر دو پوشش دیده شد و در نقاط دیگر اندومنتر دیده نشد.

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

**کلیدواژگان:** اندومنتر، اینتگرین، چرخه استروس، ایمونوهیستوشیمی

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

Email: salehnim@modares.ac.ir

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

برای اتصال ایнтگرین به ماتریکس خارج سلولی نیاز به لیگاندهای ویژه‌ای از جمله کلاژن IV (Collagen IV)، فیبرونکتین (Fibronectin)، لامینین (Laminin) و استئوپوتین (OPN) است [۲] و از میان آن‌ها OPN به عنوان 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، به وسیله سلول‌های مرحله ترشحی 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 پراکنده‌گی و نقش اینتگرین‌ها در آماده کردن رحم به خصوص در پنجره لانه‌گزینی ضرورت بررسی بیان اینتگرین‌ها و لیگاند OPN در مراحل مختلف چرخه استرووس (Estrous cycle) مدل موشی احساس می‌شد تا بتوان از اطلاعات حاصل از این تحقیق در مطالعات بعدی به منظور بررسی مداخلات هورمون‌های تخدمانی در تغییر الگوی بروز این پروتئین‌های اتصالی استفاده نمود.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۱-۲- 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 استرووس شامل پرو استرووس (Proestrous)، استرووس، متاسترووس (Metestrous) و دی استرووس (Diestrous) استفاده شد و در هر گروه حداقل سه رأس موش در نظر گرفته شد.

## ۱- مقدمه

للاح، لانه‌گزینی و تشکیل جفت رویدادهای دینامیکی مستند 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 اتصالی عرض غشاء دارد که به عنوان گیرنده عمل می‌کنند. مولکول‌های اینتگرین (Integrin) گیرنده‌های گلیکوپروتئینی عرض غشاء هستند و ساختمان هترودایمیریک (زنجیره  $\alpha$  و زنجیره  $\beta$ ) با اتصال غیرکووالانسی دارند و در تمام مراحل باروری، للاح، لانه‌گزینی و تکوین جفت مداخله می‌کنند [۲]. اینتگرین‌ها عملکردهای متفاوتی در انواع سلول‌ها دارند. در سلول‌هایی از جمله پوششی، اندوتیالی یا عضلانی بقای سلولی بسته به ارسال علامت (Signal) از طریق اینتگرین‌ها است، بنابراین در یک جمله می‌توان گفت اینتگرین‌ها به عنوان مبدل‌های علامتی عمل می‌کنند و مسیر پیام‌های درون سلولی متفاوتی را هنگام فعال شدن به دنبال 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 هترودایمیرهای 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] به عنوان مثال در انسان و پریمات‌ها نشان داده شده که بیان سه مولکول اینتگرینی  $\alpha 1 \beta 1$ ،  $\alpha 4 \beta 1$  و  $\alpha 1 \beta 3$  طی چرخه تولیدمثلی تحت تأثیر هورمون‌های تخدمانی است و در بیماران نازا در دریچه لانه‌گزینی کاهش بیان  $\alpha 1 \beta 3$  و  $\alpha 1$  ملاحظه شد [۴، ۵]؛ اما کیمینس (Kimmens) نشان داد در مدل نشخوارکنندگان

پتری دیش مرطوب قرار گرفته و روی هر لام ابتدا چند قطره از آنتی بادی های اولیه رقیق شده به طور جداگانه قرار داده شد (رقت های مورد استفاده برای آنتی بادی های مختلف عبارت بود از  $\alpha v$ : $1:100$ ,  $\beta 1$ : $1:50$ ,  $\alpha 4$ : $1:40$ ,  $\alpha v$ : $1:50$  و  $\beta 3$ : $1:50$ ). سپس به مدت یک شب کلیه ظروف در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) قرار گرفت و آنتی بادی های اضافی با PBS شسته شد. ۲-۳ قطره از آنتی بادی ثانویه کوترو گه شده با فلوروسین ایزو تیو سیانید Anti-Rabbit (Fluorescein isothiocyanate: FITC)  $1:500$  (Anti-Rat:  $1:150$ ) روی هر لام ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شدند. بعد از طی ۲ ساعت نمونه ها دو بار با PBS شسته و با چسب بافر گلیسرون لاملاً ها روی لام قرار داده شد سپس نمونه ها با میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی و کنترل داخلی نیز استفاده شد.

### ۳- نتایج

#### ۱-۳- تعیین چرخه استتروس

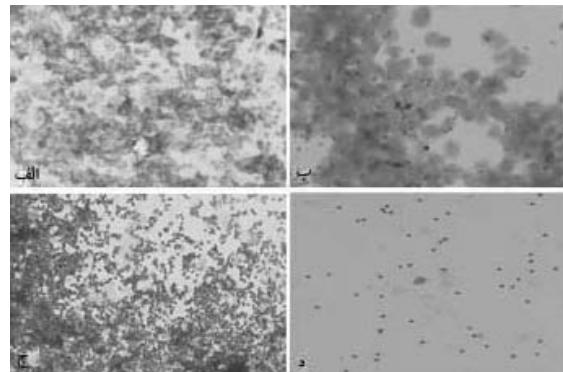
ابتدا اسمیر واژن تهیه شد و مراحل مختلف چرخه استتروس براساس نسبت سلول های موجود در اسمیر تعیین شد (شکل ۱). در مرحله پرواستتروس اکثر سلول ها، سلول های پوشش گرد و بزرگ هستند و گاهی اوقات آثاری از شاخی شدن در سلول ها دیده می شود. گاهی اوقات در این مرحله تعداد کمی لکوسیت نیز مشاهده می شود. در مرحله استتروس اکثر سلول ها از نوع سلول های پوشش شاخی هستند، سلول های مذکور به هم دیگر وصل شده و ورقه های بزرگ سلولی را تشکیل می دهند. در مرحله مت استتروس سلول های شاخی چجار بیکنوز (Pyknosis) شده و تعداد زیادی لکوسیت در اسمیر واژنی دیده می شود. در مرحله دی استتروس تعداد سلول های واژنی کم و غالباً لکوسیت هستند.

#### ۲-۳- مشاهدات ایمونو هیستوشیمی

با استفاده از این روش بیان مولکول های اینتگرینی  $\alpha 4$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 3$  و لیگاند OPN در کلیه مراحل چرخه استتروس ارزیابی شد. در سه مرحله پرواستتروس، استتروس و

#### ۲-۲- تعیین مراحل چرخه استتروس

مراحل چرخه استتروس برای هر موش با بررسی اسمیر واژن تعیین شد. مراحل چرخه استتروس با توجه به نسبت سلول های موجود در اسمیر پس از رنگ آمیزی با متیلن بلو (Methylene blue) تعیین شد. هر حیوان براساس سلول شناسی اسمیر واژنی در یکی از چهار مرحله پرواستتروس، استتروس، مت استتروس و دی استتروس طبقه بندی شد (شکل ۱).



شکل ۱ سلول شناسی اسمیر واژن در مراحل مختلف از چرخه استتروس؛ الف: پرواستتروس (بزرگنمایی  $\times 400$ )، ب: استتروس (بزرگنمایی  $\times 400$ )، ج: مت استتروس (بزرگنمایی  $\times 400$ )، د: دی استتروس (بزرگنمایی  $\times 400$ )

#### ۳-۲- تهیه نمونه

پس از تعیین مراحل چرخه استتروس در هر مرحله تعداد حداقل سه رأس موش در نظر گرفته شد، سپس موش ها به طریق جابه جایی مهره های گردانی کشته شده و یک نمونه بافتی حدود ۲ میلی متر از  $\frac{1}{3}$  میانی شاخ رحمی به منظور مطالعه ایمونو هیستوشیمی (Immunohistochemistry) تهیه شد.

#### ۴-۲- ایمونو هیستوشیمی

برای مطالعه ایمونو هیستوشیمی لام ها بعد از ثبیت شدن با پارافرمالدهید با PBS (Phosphate Buffered Saline) شسته شده و سپس به ترتیب ۳۰ دقیقه در محلول اسید کلریدریک دو نرمال، ۵ دقیقه در محلول با فربورات و به مدت  $0/5$  ساعت تحت تأثیر محلول تریتون X۱۰۰ (۱۰۰۰ لاندا بافر فسفات، ۳ لاندا تریتون، ۱۰۰ لاندا سرم بز) قرار داده شدند. سپس لام ها داخل یک

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

## ۴- بحث

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

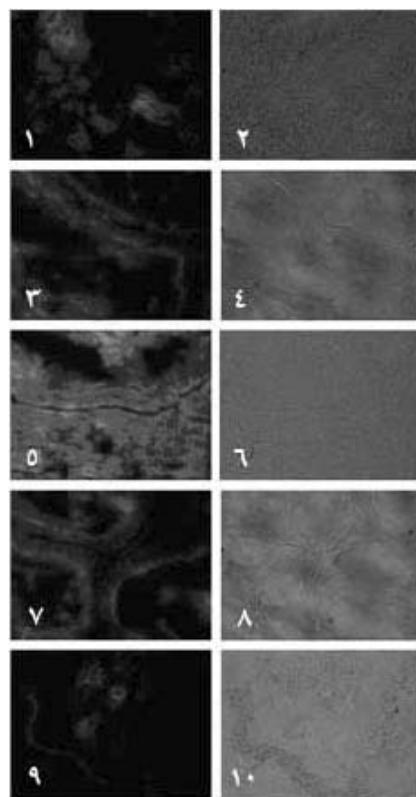
در تأیید این موضوع **فضل عباس** (Fazleabas) و **همکارانش** نشان دادند که بیان اینتگرین در رحم میمون تحت کنترل هورمون پروژسترون است [۵].

**کروس** (Creus) و **همکارانش** عنوان کردند که بیان اینتگرین  $\alpha v \beta 3$  در اندومنتر انسان به بلوغ اندومنتر 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 حالی که افزایش بیان این زیر واحد اینتگرینی در مرحله تکثیر به این اندازه نبود. این خود می‌تواند بیانگر واپستگی بیان زیرگروه‌های اینتگرینی به هورمون‌های جنسی و اثر این

دیاستتروس این پاسخ منفی بود و تنها در مرحله متاستتروس مثبت بود. مکان‌های بروز این پروتئین در پوشش سطحی (غشای رأسی و قاعده‌ای)، پوشش غده‌ای (غشای رأسی و قاعده‌ای) و استرومای (stroma) ارزیابی شد که نتایج ایمونوھیستوشیمی آن در جدول ۱ آمده است.

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

استرومای	پوشش سطحی			پوشش قاعده‌ای	
	غشای رأسی	غشای قاعده‌ای	غشای رأسی		
منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	$\alpha v$
منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	$\beta 3$
منفی	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	$\alpha 4$
منفی	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	$\beta 1$
منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	OPN



شکل ۲ ایمونوھیستوشیمی اینتگرین‌های  $\alpha v$  (۱),  $\beta 3$  (۲),  $\alpha 4$  (۳),  $\beta 1$  (۴, ۷) و لیگاند آن‌ها OPN (۹)، در مقاطع عرضی بافت اندومنتر موش و در مرحله متاستتروس از چرخه استتروس (بزرگنمایی  $\times 400$ )، لازم به ذکر است که ستون اول مشاهدات با میکروسکوپ فلوروسنت و ستون دوم تصاویر مرحله کنترast همان برش‌ها در ستون مقابل است.

رویان‌های 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  $\alpha v$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  و  $\beta 4$  در سلول‌های تروفوبلاست جنینی قبل از جایگزینی بروز می‌کنند [۱۴, ۱۵].

از آنجایی که در بین لیگاند‌های ایتگرینی، OPN قادر به برقراری ارتباط با اکثر ایتگرین‌ها 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 دریجه لانه‌گزینی طیف وسیعی از ایتگرین‌ها را در سطح خود بیان می‌کند که فنوتیپ آن‌ها دائمًا در حال تغییر است. حضور OPN آن هم در غشای رأسی هر دو پوشش سطحی و غده‌ای بیانگر واکنش ایتگرین‌های 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 ایتگرین‌ها 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 واپستگی بیان این پروتئین به هورمون‌های جنسی و اثر این هورمون‌ها بر لیگاند ایتگرین‌ها در رحم باشد [۱۶].

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

هورمون‌ها بر اندومنتر رحم باشد [۱۲].

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

همچنین بخش دیگری از نتایج این تحقیق نشان داد که از نظر مکان بروز، ایتگرین‌های مختلف در مرحله متاستروس تفاوت دارند. ایتگرین  $\alpha v$  تنها در پوشش غددی، ایتگرین  $\beta 3$  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 ایتگرینی بود که بیان آن هم در پوشش سطحی و غددی و هم در استرومای دیده شد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که مکان‌های متفاوتی از بیان ایتگرین‌ها در اندومنتر 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 اندومنتر و ایتگرین‌هایی که در پوشش غددی و استرومای بیان شدند ( $\alpha v$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 1$ ) در گسترش و نفوذ جنین به این بافت مداخله می‌کنند.

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

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

بلور (Bloor) و همکارانش بیان  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha v$  را در

نفوذپذیری بیشتر مؤثر است [۱۶].

بنابراین براساس یافته‌های این تحقیق به‌نظر می‌رسد که بیان ایнтگرین‌ها 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.

## ۵- تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر در گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است؛ بنابراین نویسنده‌گان 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.

## 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] Kimmens S, Lim HC, Maclare 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. Guidebook 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 a4 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<sup>۱</sup>، پرویز عبدالمالکی<sup>۲\*</sup>، سید جواد مولی<sup>۳</sup>، فائزه قناتی<sup>۴</sup>، ذینب توسلی<sup>۱</sup>، عمران حشمتی<sup>۱</sup>

- 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

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۲۲  
پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

### چکیده

هدف: میدان‌های مغناطیسی از بدیده‌هایی 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 سلطان‌ها همچون سلطان خون به خوبی نشان داده است. در آزمایش‌های گوناگون دانشمندان کوشیده‌اند تا به ساز و کار این اثرهای زیستی پی ببرند؛ اما داده‌های به دست آمده بسیار ناهمانگ 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 ری یاخته‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان موش صحرایی سنجیده شد. برای این کار روش فلوسانیومتری با فلوروکروم پروپیدیوم یدید به کار گرفته شد که با تشخیص محوای DNA یاخته‌ها می‌تواند برازی پی بردن به مرحله‌ای که سلول در آن به سرمه برداشته شد. میدان مغناطیسی به کار گرفته شده حاصل از عبور جریان ۱۲ آمپری از سیم پیچ‌ها با بزرگی ۱۵ میلی‌تسلا اعمال شد.

نتایج: با آنالیز چرخه یاخته‌ای دگرگونی یاخته‌ای در مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای دیده شد؛ به گونه‌ای 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 شیمیابی 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: ۱۴۱۱۵-۱۷۵

Email: parviz@modares.ac.ir

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

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

## ۱- مقدمه

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 مقاعده 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 سلول‌ها (Static magnetic field) بر تغییر طول مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای است، چرا که هر گونه اثر استرسی وارد بر سلول یا تغییر در سیتیک واکنش‌های ساخت و ترمیم یاخته‌ای می‌تواند در چرخه یاخته‌ای نمود پیدا کند.

بؤئمی (Buemi) و همکارانش (۲۰۰۱) اثرهای میدان مغناطیسی ایستای ۰/۵ میلی‌تسلایی را بر رشد و مرگ و میر یاخته‌های کلیوی (VERO) و بافت ستاره‌ای قشری موش صحرابی 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 تسلایی قرار گرفتند. میزان جهش در جهش‌یافته‌های اکسیداتیو کاستی داشتند به طور قابل توجهی افزایش یافت [۶].

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

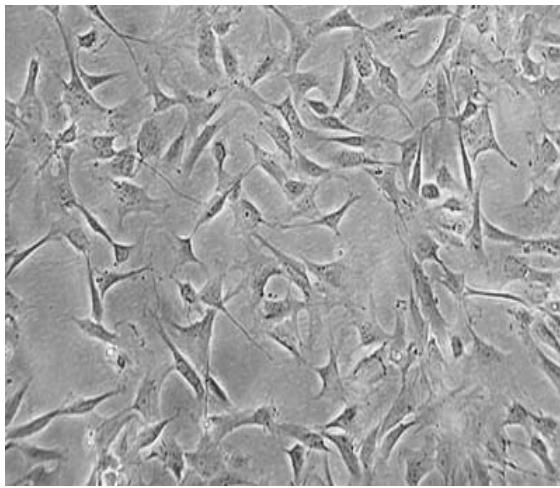
زمیسلونی (Zmyslony) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با به کارگیری روش سنجش کامت، دریافتند هنگامی که یاخته‌های

نخستین نشانه از واکنش مستقیم میان میدان‌های مغناطیسی و جهان زنده در سال ۱۹۸۰، با شناسایی باکتری‌های مگنتوتاکتیک (Magnetotactic bacteria) بدست آمد. این تک یاخته‌های بی‌هوایی دارای زنجیره‌ای از بلورهای مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Magnetite crystal هستند [۳-۴]. مگنتیت در یاخته‌های گوناگون از خزه 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 به میان 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 پیداکش حالت سه‌گانه (Triplet) (جفت رادیکالی که در میدان مغناطیسی بیرونی ترازهای انرژیش 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 پیداکش پیوند به یک جفت رادیکال یگانه (Singlet) (جفت رادیکالی که در میدان مغناطیسی بیرونی ترازهای انرژیش 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

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 میلی لیتر از محیط کشت  $\alpha$ -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  $\text{CO}_2$  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 صحرابی

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  $\text{FeCl}_2$  همزمان در میدان مغناطیسی ۷ میلی‌تسلایی 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 Tesla با گرadiان ۴۱/۷ Tesla 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 میلی‌تسلایی گذاشتند. این میدان مغناطیسی ایستا هیچ‌گونه اثری بر مرگ (Necrosis) و نکروزیس (Apoptosis)، تندری رفتن یاخته از نکروز پسین به مرگ برنامه‌ریزی شده، افزایش داشت [۱۰].

جاجته (Jajte) و همکارانش افزایشی را در شمار آسیب‌های DNA یاخته‌های لنفوسيت خونی که همزمان در کلرید آهن II و میدان مغناطیسی ایستای ۷ میلی‌تسلایی 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 به عنوان 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 صحرابی جوان (۱-۳ ماه) از مؤسسه تحقیقاتی

برای تیمار با میدان مغناطیسی آماده‌اند. محیط کشت تازه ۴۸ ساعت پس از هر واکشت جایگرین 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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  در این بازه زمانی و بازه‌های زمانی کوتاه‌تر، قابل چشم‌پوشی است.

## 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 جریان‌گذری ۵۰ آمپر، می‌تواند میدان مغناطیسی تا ۵۰ میلی‌تسلا (با شدت بهینه ۲۵ میلی‌تسلا) را پدید آورد. یک ترانس که چشمۀ جریان الکتریسیته 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 بازو‌هایی به گوشی‌های آهنین می‌رسد و ما میدان یکنواختی را در میان آن دو خواهیم داشت. این گوشی‌های گرد آهنین بالایه 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 سلامتر کالیبره شود. از آن‌جا که جریان بالای الکتریسیته با گرمایشی 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

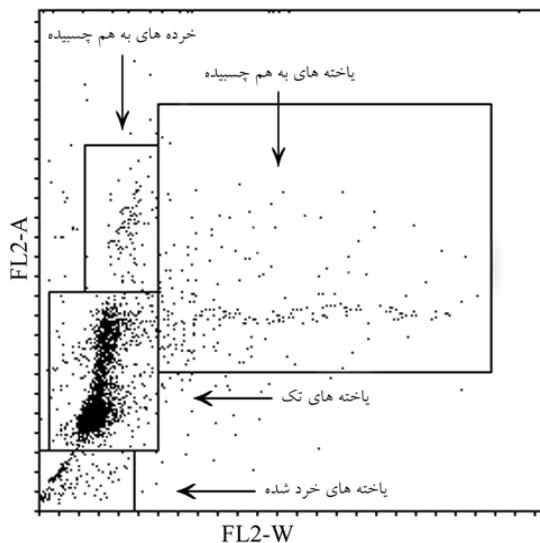
## ۴-۲- آنالیز یاخته‌های رنگ‌آمیزی شده به کمک

### (Flow cytometry)

فلوسایتمتری با به کارگیری 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 به دست آمده در این روش نشان‌دهنده اندازه نسبی یاخته‌ها، گرانولیتی نسبی یا میزان پیچیدگی درونی یاخته‌ها و میزان نسبی فلورسانس است [۱۴].

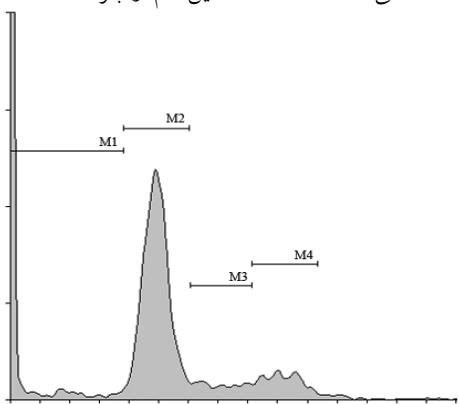
یاخته‌های خونی از بهترین نمونه‌ها برای به کارگیری در فلوسایتمتری است؛ چرا که آن‌ها خود یاخته‌هایی تک تک بوده و به آسانی سوسپانسیون می‌دهند؛ اما یاخته‌های استرومای مغز استخوان از دید کشت یاخته‌ای، در رده یاخته‌های چسبان

چسبیده، خرد شده و همچنین یاخته‌های خرد شده‌ای که اکنون بهم 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 پهنه‌ای 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 به کار گیری روش فلوسایتومتری در این گونه یاخته‌ها، نخست باید آن‌ها را از کف فلاسک دارای محیط کشت جدا کرد و آن‌گاه با پیپتاژ شدید با کمترین آسیب به یاخته‌ها آن‌ها را به صورت تک در آورد. با این همه باز هم یاخته‌های بهم 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 می‌کنند. داده‌های به دست آمده از دستگاه فلوسایتومتر خام بوده و برای بازیابی داده‌ها، نرم‌افزارهای ویژه‌ای همچون شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون را از دل داده‌های خام نخستین دستگاه بیرون آورده.

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

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

که در آن  $T_C$  طول چرخه یاخته‌ای و  $f_S$  نسبت شمار یاخته‌ای که در مرحله S از این چرخه هستند به همه یاخته‌ها است [۱۵].

در این تحقیق، با به کار گیری فلوروکروم پروپیدیوم (fluorocromes Propidum 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 به دست 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 تک تک، بهم

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 کترل نامیده می‌شود؛ یک فلاسک CB دارای محیط کشت که در میدان مغناطیسی ۱۵ میلی‌تسلایی 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 دسته‌بندی یاخته‌های بنیادی برای تیمار با پراکسید هیدروژن و میدان مغناطیسی

زمان	میدان مغناطیسی	پراکسید هیدروژن	گروه‌های آزمایشی
۵ ساعت	-	-	C
۵ ساعت	۱۵ میلی‌تسلا	-	CB
۵ ساعت	-	۱۰۰ میکرومولار	H
۵ ساعت	۱۵ میلی‌تسلا	۱۰۰ میکرومولار	HB

فلاسک‌های یاخته‌ای که هر کدام بیش از یک میلیون یاخته داشتند، برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلایی جای گرفتند. این یاخته‌ها پس از میدان‌گیری، بی‌درنگ از فلاسک‌ها جدا و پس از سانتریفوژ در یک بخش محلول بافر فسفات و چهار بخش الكل ۷۰ درجه ثبیت و پس از ۲۴ ساعت رنگ‌آمیزی و در دستگاه فلوسایوتومتر بکتون- دیکینسون ارزیابی شدند. از هر کووت درست ۱۰۰۰۰ یاخته شمرده می‌شود که اندکی از آن‌ها، یاخته‌های بهم چسبیده و اندکی یاخته‌های خرد شده و گاه خرده یاخته‌های بهم چسبیده هستند. در ارزیابی داده‌ها تنها یاخته‌هایی که تک‌تک هستند جدا شدند. براساس هیستوگرام‌هایی حاصل از یاخته‌های جدا شده تکی، شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون به دست می‌آید. پس از به انجام رسیدن کارهای گفته شده روی یکایک فلاسک‌ها و تیمار یاخته‌ها با سه تکرار، شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون به دست آمد. جدول ۲ داده‌هایی که نشان‌دهنده درصد یاخته‌ها در این مراحل است را نشان می‌دهد.

قله دوم که کوتاه‌تر از قله پیشین است، یاخته‌هایی را که در مراحل G2 و M هستند نمایش می‌دهد. بازه‌ای از نمودار که در میان این دو جای می‌گیرد نشان‌دهنده مرحله S و بازه‌ای که پیش از قله نخست جای دارد، نشان‌دهنده یاخته‌هایی است که دچار مرگ برنامه‌ریزی شده یا نکروزیس شده‌اند [۱۵]. گفتنی است در بسیاری از کارهای پیشین که از این روش بهره برده‌اند، نامی از نکروزیس در اینجا برده نشده و این شمار از یاخته‌ها، همه مرگ برنامه‌ریزی شده به‌شمار آمده‌اند. در این نمودار M1 نشان‌دهنده بخش پیش از G0 و G1 است که درباره آن گفته شد؛ M2 نشان‌دهنده مراحل G0 و G1، M3 نشان‌دهنده مرحله S و M4 نشان‌دهنده مراحل G2 و M است.

## ۵-۵- آنالیز آماری

همه آزمون‌ها با سهبار تکرار به انجام رسید و داده‌های گزارش شده، نشان‌دهنده میانگین این سه با افزایش و کاهش انحراف معیار است. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و برای ارزش‌گذاری به آن‌ها، آزمون T-test برای نمونه‌های مستقل از هم به کار گرفته شد که داده‌های با مقادیر احتمال (P-value) کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

## ۳- نتایج

در بررسی دگرگونی چرخه یاخته‌ای که با کمک روش فلوسایوتومتری به انجام رسید، چرخه یاخته‌ای یاخته‌های ناهمانگ در رشد، پس از این‌که برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلایی بودند، سنجیده شد. همان‌گونه که پیش از این گفته شد طول هریک از مراحل از روی تعداد یاخته‌هایی که در آن مرحله شمرده شده‌اند به دست آمد.

همان‌گونه که در جدول دیده می‌شود یاخته‌هایی که درون فلاسک‌ها بودند نخست به دو دسته بخش شدند. یک دسته دارای محیط کشت تنها و دسته دیگر دارای ۱۰۰

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 هماندسازی DNA را در گذرگاه‌ها یا جایگاه‌های بازررسی ویژه‌ای بازنگری کنند. گذرگاه‌های گفته شده با پاسخ دادن به نشانه‌های برون یاخته‌ای فرایند زایش یاخته‌ای را کنترل کرده و بدین‌گونه یاخته را با پیرامون خود سازگارتر می‌کنند [۱].

در کنار این پدیده، اگر ناهنجاری‌ها در ساختار DNA به گونه‌ای باشد که نشان‌دهنده درستی فرایند هماندسازی 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].

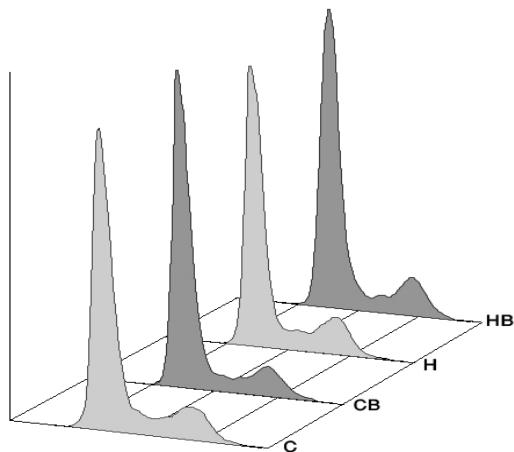
به عبارت دیگر، جایگاه‌های بازررسی یاخته‌ای را می‌توان سه دسته کرد. جایگاه‌هایی در پایان G1 و در سرتاسر S DNA را از گزند آسیب نگهداری می‌کنند. جایگاه دیگری در G2 درستی هماندسازی و نبود آسیب‌های کروموزومی را برای رفتن یاخته به میتوز و جایگاه پایانی در میتوز، درستی فرایندهای میتوزی را پاسبانی می‌کند میدان‌های مغناطیسی نیز همچون جهش‌ Zahای شیمیایی و پرتوهای یون‌زا، شاید جایگاه‌های بازررسی چرخه‌ای را راهاندازی کنند [۱۷]. این جایگاه‌های بازررسی 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 هر گونه آسیب در ماده ژنتیکی یاخته می‌تواند باعث تجمع یاخته‌ها در مراحل پیش از این جایگاه‌های بازررسی 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 برانگیزندۀ بیرونی یا درونی به پیرامون خود پاسخ می‌دهد. یک پاسخ، بردن یاخته به مرحله‌ای است که در آن چرخه از پیشروی بازداشت شود، همانند آنچه در G1 دیده می‌شود [۱۷].

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 معنی دار آماری در داده‌های مربوطه است.

G2/M	S	G0/G1	گروه‌های آزمایشی
۱۲/۸۸ ± ۰/۰۷ <sup>a</sup>	۹/۰۶ ± ۰/۸۵ <sup>a</sup>	۷۷/۹۰ ± ۰/۸۵ <sup>a</sup>	C
۱۱/۰۴ ± ۰/۹۵ <sup>b</sup>	۸/۰۹ ± ۱/۰۷ <sup>a</sup>	۷۹/۱۲ ± ۱/۵۱ <sup>b</sup>	CB
۱۲/۳۸ ± ۰/۱۵ <sup>c</sup>	۱۰/۳۹ ± ۰/۰۹ <sup>b</sup>	۷۵/۹۶ ± ۰/۲۴ <sup>c</sup>	H
۱۲/۴۱ ± ۰/۰۸ <sup>ac</sup>	۸/۰۷۳ ± ۰/۰۷ <sup>ac</sup>	۷۷/۹۵ ± ۱/۱۸ <sup>ab</sup>	HB

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 این که یاخته‌ها در میدان مغناطیسی جای گرفته‌اند در هر دو تیمار با پراکسید هیدروژن و بدون پراکسید هیدروژن، درصد یاخته‌ها در مرحله G0/G1 افزایش معنی داری داشته است. همچنین درصد یاخته‌ها در مرحله S نیز کاهش معنی داری یافته است.

## ۴- بحث

همان‌گونه که می‌دانیم تنها هدف یاخته از میتوز، پدید

همچنین در مرحله S از چرخه یاخته‌ای نیز، کاهشی 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 مختصراً را می‌توان به طولانی شدن مرحله G0/G1 چرخه و کوچک شدن کسر یاخته‌های مرحله S به کل دانست. با توجه به این که یاخته‌ها همگام یا همزمان نبوده‌اند نمی‌توان به درستی در این باره سختی به میان 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 به عنوان 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 این چنینی 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

نویسندهای 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.

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] 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 به طور مستقیم بر مولکول‌ها اثرگذار باشد، فرایندهای غیرمستقیم با واسطه‌های رادیکالی محتمل‌ترین مکانیسم به شمار می‌آید.

یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی در طولانی شدن مرحله G1 می‌تواند درگیر شدن پروتئینی به نام p53 باشد [۱۹]. این پروتئین، یک پروتئین راهم‌داز است به گونه‌ای که آغازگر رونویسی دیگر ژن‌ها است. برای نمونه در فرایند بازداری در p53، G1 بранگیزندۀ تولید تنظیم‌کننده‌گان منفی است که کمپلکس G1-cyclin-Cdk را ناکارامد می‌کند [۲۰]. همان‌طور که می‌دانیم این گونه کمپلکس‌ها در پیش روی چرخه یاخته‌ای نقش بزرگی بازی می‌کنند و ناکارامدی آن‌ها، از گذر یاخته به مرحله دیگر جلوگیری می‌کند.

آسیب به DNA در G1، یاخته را از پیش روی در چرخه باز می‌دارد و پروتئین p53 را پایدار می‌کند. p53 خود پیوسته به هنگام چرخه یاخته‌ای ساخته می‌شود و تغییر این پروتئین، باعث تثیت غلظت آن در یاخته است [۱۹]. به هنگام 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

- [1] Reynolds RJ, Schecher 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. 3<sup>rd</sup> 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] Zmyślon 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, Grzegorczyk J, Zmyslony M, Rajkowska E. Effect of 7mT static magnetic field and iron ions on ratlymphocytes: apoptosis, necrosis and free radiacal processes. *Bioelectrochemistry* 2002; 57(2): 107-111.
- [12] Flipo D, Fournier M, Benquet C, Roux P, Le Boulaire C, Pinsky C, LaBella FS, Krzystyniak K. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca<sup>2+</sup>, 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<sup>2+</sup> influx. *FASEB J* 1999; 13(1): 95-102.
- [14] Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4<sup>th</sup> Edition, John Willy & Sons. Inc., 2003; p: 101-214.
- [15] Celis JE. *Cell Biology*. 3<sup>th</sup> Edition, Vol.3, Academic Press, New York, 2004; 279-89.
- [16] Teresa S. & Hawley RG. *Flow Cytometry Protocols*. 2<sup>nd</sup> 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 توالی‌بایی ژن

### Leishmania homologue of receptors for activated C kinase (LACK) لیشمانا مازور سویه استاندارد ایرانی

اوغل نیاز جرجانی<sup>۱</sup>، فاطمه غفاری فر<sup>۲\*</sup>، زهرا شریفی<sup>۳</sup>، عبدالحسین دلیمی<sup>۴</sup>، زهیر محمد حسن<sup>۵</sup>

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

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۶ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۵

#### چکیده

هدف: لیشماناژیس جزء بیماری‌های عفونی-انگلی مهم دنیاست که توسط تک یاخته‌های نسجی خونی داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانا ایجاد می‌شود. ژن LACK یک پروتئین ۳۶ کیلو Daltonی است که در فرم‌های پروماتیگوت و آماستیگوت انگل، در گونه‌های مختلف لیشمانا به مقدار بالای وجود دارد. LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می‌کند؛ بنابراین این ژن برای تهیه آنتی ژن نوترکیب مناسب بوده و انتخاب خوبی به عنوان واکسن DNA علیه لیشمانا مازور است، این مطالعه با هدف کلون نمودن ژن LACK لیشمانا مازور ایران برای تولید پروتئین نوترکیب برای ساخت واکسن انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق DNA از سویه استاندارد ایرانی لیشمانا مازور (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 توالی‌بایی شد.

نتایج: آنالیز تعیین توالی ژن LACK لیشمانا مازور کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T ۹۳۹ مشخص کرد که قطعه‌ای ۹۳۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن LACK لیشمانا مازور 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 به دست آمده نشان داد که این ژن با موفقیت تکثیر و کلون شده و از این کلون می‌توان کلون‌هایی در پلاسمید بیانی پروکاریوتی برای تهیه آنتی ژن نوترکیب و پلاسمید یوکاریوتی برای تهیه واکسن استفاده کرد. این مطالعه راهی برای پیشرفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب برای مطالعات آینده است.

کلیدواژگان: کلونینگ، توالی‌بایی، لیشمانا مازور، LACK

\* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱  
Email: ghafarif@modares.ac.ir

و سلولی اختصاصی است که با تزریق پلاسمید DNA برخنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پرتوئین کد شده را بیان می‌کنند. واکسیناسیون ژنی پاسخ‌های ایمنی مؤثر و طولانی مدتی القاء می‌کنند که از طریق سیستم MHC-II، (Major Histocompatibility Complex) MHC-I 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 کنند، صورت گرفته است. پیشتر این کارها روی آنتی‌ژنهای Ribosomal like Protein P20، LmSTI1، Leif PSA2 M2، Histon H1، P8، P4، A2، CP (A,B)، GP64، GP63 متتمرکر شده است که به عنوان گرینهای واکسن شناسایی شده‌اند ولی هیچ کدام ایجاد پاسخ‌های ایمنی کاملی نمی‌کنند اما در این میان (Leishmania homologue of receptors for activated C kinase) LACK یکی از کاندیدهای اصلی واکسن است که بیان قوی دارد [۱۱-۱۴]. LACK لیشمانیا مازور (*L. major*)، پروتئین ۳۶ کیلو Daltonی بوده و در فرم‌های پرماستیگوت (Promastigote) و آماتیگوت (Amastigote) و در گونه‌های مختلف لیشمانیا وجود دارد. همچنین همولوژی و شیاهت زیادی با پرتوئین 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، ایترلوکین ۴ (Interleukin 4: IL-4) تولید می‌کنند، بنابراین تحملی علیه LACK ایجاد می‌شود که نتیجه بیان ترانس‌ژنیک LACK در تیموس است. در نتیجه باعث مقاومت علیه عفونت لیشمانیوزیس می‌شود.

اگر در ایمنی زایی علیه لیشمانیوزیس، همراه با DNA IL-12 استفاده شود باعث تولید ایترفرون گاما (Interferon gamma: IFN- $\gamma$ ) و حفظ و اثربخشی پاسخ (T helper 1) Th1 می‌شود [۱۹].

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

## ۱- مقدمه

لیشمانیوزیس (Leishmaniosis) 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 مضلات 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) سایر بیماری‌های ناتوان کننده سیستم ایمنی در کشورهای پیشرفت‌های 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

۵'-ATT AAG CTT ATG AAC  
TAC GAG GGT CAC CTG AAG GG-3'  
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: واسرتستگی اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، واسرتستگی ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال (Annealing) ۳۰ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد و بسط (Extension) ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد؛ سه مرحله اخیر ۳۰ چرخه تکرار شد و در نهایت واکنش PCR با بسط نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ دمای درجه سانتی گراد به اتمام رسید.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و از طریق رنگ آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) قابل مشاهده است. محصول DNA را می‌توان تحت تابش نور مأموری بتنفس (Ultra Violet: UV) مشاهده کرد. نشانگر (Marker) ۱ کیلو جفت بازی برای تعیین ۹۵۷ کردن محصول PCR استفاده شد. محصول PCR، باند جفت بازی 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.

**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 برش دهنده مناسب بریده شد. سپس به DNA هدف با انتهای مشابه متصل شد و یک پلاسمید نوترکیب (Recombinant Plasmid) به وجود آمد [۲۲، ۲۳].

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- انگل لیشمانا مژور

در این تحقیق از سویه استاندارد ایرانی لیشمانا مژور تهیه شده از انسستیتو پاستور که دارای کد بین‌المللی MRHO/IR/75/ER است، استفاده شد.

برای تولید انبوه انگل و تهیه آنتی ژن، پرماسیستیگوت‌های انگل لیشمانا مژور در محیط RPMI-1640 که حاوی ۱۰<sup>۲۰</sup> درصد سرم جنین گاو غیرفعال شده و ۱۰۰ واحد پنی سیلین (Penicillin) در میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکروگرم استریتومایسین (Streptomycin) در میلی‌لیتر است، در دمای ۲۵±۱ درجه سانتی گراد 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 ۵×۱۰<sup>۷</sup>) از پرماسیستیگوت‌های تغذیظ شده و شستشو شده با بافر (Phosphate Buffered Saline) PBS درون یک ویال ۱/۵ سی سی ریخته شد و با ۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز مخلوط شد. به منظور لیز شدن پرماسیستیگوت‌ها، ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K به ویال اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در بن‌ماری ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد [۲۱، ۲۰]. استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم انجام شد [۲۲، ۲۳].

### ۲-۳- تکثیر DNA با روش PCR

محصول DNA استخراج شده از پرماسیستیگوت‌ها به عنوان الگو برای تکثیر قطعه ژن LACK به وسیله 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 *Taq* Mix، 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:

آمپیسیلین (Ampicillin) به آکار اضافه شد، کلونی‌های فقد پلاسمید نوترکیب که در آن‌ها بتاگالاکتوزیداز ستر می‌شود به رنگ آبی درآمدند؛ در حالی که کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، چون قادر به ساخت بتاگالاکتوزیداز نیستند به رنگ سفید بود.

## ۷-۲- 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.

## ۸-۲- مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی و سفید

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

## ۹-۲- قطعه PCR با استفاده از pTZ57R/T-LACK پلاسمید نوترکیب

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 (۱۰۰-۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) به عنوان الگو انجام شد.

محصول PCR روی ژل آکارز ۱ درصد الکتروفورز شد. نشانگر ۱ کیلو جفت‌بازی (Fermentas) برای تعیین کردن محصول PCR استفاده شد.

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.

## ۵-۲- 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 میکروفیوز (Microfuge) حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد از فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد در آورده و به مدت نیم ساعت درون ظرف یخ گذاشته شد تا به دمای صفر درجه سانتی گراد برسد. ۵ 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 سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلا فاصله 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 سانتی گراد قرار داده شد. پس از دریافت DNA خارجی توسط سلول‌ها می‌توان آن‌ها را به طور مستقیم کشت داد.

## ۶-۲- 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. (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) X-gal همراه با یک القاء‌کننده آنزیم یعنی ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوید (Isopropyl β - D - 1 - thiogalactopyranoside: IPTG) و

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

### ۳- نتایج

پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماذور توسط بافر لیز و پروتئیناز K به خوبی لیز شده‌اند و DNA ژنومی با فنل-کلروفرم استخراج شده است.

نسبت جذب DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) 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 لیشمانیا ماذور 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 لیشمانیا ماذور با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱ درصد؛ ستون ۱: محصول PCR (قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی ژن LACK)، ستون ۲: نشانگر ۱ کیلوجفت‌بازی

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

این روش برای بررسی وجود قطعه DNA خارجی در پلاسمید به کار می‌رود. براساس جایگاه‌های برش آنزیم روی DNA حامل، قطعات حاصل از هضم آنزیمی پیش‌بینی شد. به‌همین منظور DNA پلاسمیدی نوترکیب همزمان با پلاسمید حامل (به عنوان 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 ورتكس (Vortex) کردن، به مدت ۲-۱ ساعت یا شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

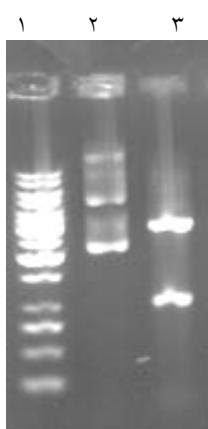
DNA پلاسمیدی (۳-۱ میکروگرم) ۵ میکرولیتر  
باfer X ۱۰ میکرولیتر  
آنزیم برش دهنده EcoRI (۱۰ واحد) ۱ میکرولیتر  
آب مقطر ۱۲ میکرولیتر

برش آنزیمی دوم با یک میکرولیتر HindIII به‌همین روش و روی ۱۰ میکرولیتر محصول برش خورده با آنزیم ۷ EcoRI میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر باfer 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 [۲۵، ۲۴، ۲۲].

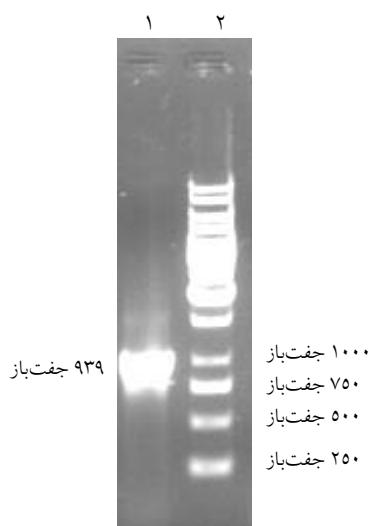
### ۱۱-۲- تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing)

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 Pioneer آلمان مطابق با دستور کار شرکت سازنده کیت و یا به روش Alkaline lysis استخراج شد و برای تعیین توالی به شرکت Gene Fanavarان ارسال شد. سپس نتیجه

آنالیز تعیین توالی ژن LACK لیشمانیا مژور 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 MRHO/IR/75/ER LACK درصد با بانک ژنی شباهت دارد (شکل ۵).

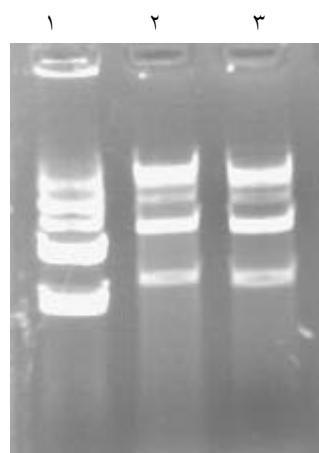


شکل ۳ الگوی الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-LACK روی ژل آگارز؛ ستون ۱: نشانگر ۱ کیلوجفت‌بازی، ستون ۲: pT-LACK که در معرض آنزیم قرار نگرفته است، ستون ۳: pTZ57R/T-LACK که با آنزیم‌های EcoRI HindIII بریده شده است.



شکل ۴ الکتروفورز محصل PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب PCR pTZ57R/T-LACK روی ژل آگارز ۱ درصد؛ ستون ۱: محصل PCR pTZ57R/T-LACK ۹۳۹ جفت‌باز با استفاده از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-LACK ستون ۲: نشانگر ۱ کیلوجفت‌بازی

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 نوترکیب pTZ57R/T-LACK

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

نتایج حاصل از الکتروفورز محصل PCR با پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-LACK به همراه آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و شرایط ایجاد شده نشان داد که قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی ژن LACK از روی پلاسمید نوترکیب، 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 لیشمانیزاسیون (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 اینمی کامل بحث جدید واکسن تزریق پلasmid DNA برخene به درون میزان، سلول‌های میزان 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 مازور پروتئین ۳۶ کیلodaltonی بوده و در فرم‌های پرموستیگوت و آماستیگوت و در گونه‌های مختلف لیشمانیا وجود دارد، همچنین همولوژی و شباهت زیادی با پروتئین (activated protein kinase C receptor) RACK-I پستانداران دارد [۱۵-۱۷].

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

### MRHO/IR/75/ER

MNYEGHLKGHGGWVTSACPQQAGSYIKVV  
STSRDGTAISWKANPDRHSaedNYGIPDHR

**Friedlin**

MNYEGHLKGHRGWVTSACPQQAGSYIKVV  
STSRDGTAISWKANPDRHSVDSDYGLPNHR

MEGHSGFVSCVSLAHATDYALTASWDHAIR  
MWDLRTGQSRKFLKHTKDVLAVAFSPDDR  
LEGHTGFVSCVSLAHATDYALTASWDRSIRM  
WDLRNGQCQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDR

LIASAGRDSVIRVWNVAGECMHEFLRDGHED  
WVSSICFSPSLDLPIVASGSWDNTIKVWN  
LIVSAGRDNVIRVWNVAGECMHEFLRDGHED  
WVSSICFSPSLEHPIVVSGSWDNTIKVWN

VNEGKCVHTLRGHKNYVSTVTPSPDGSLCAS  
GGKDGSALLWDLNSNGEQLFSIPVESPINQ  
VNNGKCERTLKGSNYVSTVTPSPDGSLCAS  
GGKDGAALLWDLSTGEQLFKINVESPINQ

IAFSPNRFWMCVATEKSL  
IAFSPNRFWMCVATERSL

شکل ۵ نتایج Blast اسیدآمینه‌های LACK لیشمانیا مازور (MRHO/IR/75/ER) در مقایسه با اسیدآمینه LACK با شماره دسترنسی 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 فرستطلب بودن بیماری در افراد با نقص اینمی 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 احتشائی) دارای اهمیت فراوان است. بیماری‌های ناتوان کننده دستگاه اینمی مانند AIDS سبب بازگشت و عود بیماری در

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

سلول‌های T علیه LACK 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 IL-12 استفاده شود باعث تولید γ IFN- 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 ایترنوتی [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) نشان داد که قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و هیچ ایترنوتی در ژن مورد نظر وجود ندارد و این ژن دارای یک اگرون 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 1\_AF363975\_1\_LmjF28.2740 در بانک ژنی از نظر توالی ۸۹ درصد شباهت و در ۲۸ اسید آمینه تفاوت دارد. این شباهت نشانگر این است که توالی ژن LACK در سویه‌های مختلف لیشمانیا ماژور به طور 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

$CD8^+$ ,  $CD4^+$  می‌شوند. واکسیناسیون ژنی مکانیسمی را برای دستیابی به ستر 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 هرینه زیاد طی فرآیند تولید، دشوار بودن خالص‌سازی تاخوردگی ناصحیح و القای ضعیف سلول‌های  $CD8^+$  T چندان مورد توجه نیستند [۳۰-۳۲]. واکسن‌های DNA در مقایسه با واکسن‌های رایج نوترکیب پروتئینی یا ویروسی و باکتریالی 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 تحلیص و تولید پروتئین نیست؛ ۵- وقتی این واکسن‌ها با پلاسمیدهای کد کننده سیتوکین‌ها (Cytokines) (اگزوژن Exogenous) مانند IL-12، IL-7 یا کموکاین‌ها (Chemokines) به عنوان تنظیم کننده پاسخ‌های ایمنی یا مولکول‌های محرك ایمنی یا ادجوانات‌های 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 گرمابوده و یکنواخت (Homogenized) هستند [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 rIL-12+LACK می‌کند، مشابه اثر حفاظتی بود که پروتئین ایجاد می‌کند ولی اثر حفاظتی که DNA LACK ایجاد

## ۵- تشكر و قدردانی

نویسنده‌گان به این وسیله از پرسنل محترم پخش تحقیقات ویروس‌شناسی سازمان انتقال خون تشكر 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.

نوترکیب) تعیین توالی شد.

کلونینگ قطعه LACK در پلاسمید pTZ57R/T (برای تکثیر زن) 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 نوترکیب 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/LmSTI1 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, Bianchettin G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni 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, Achá-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 Leishmania 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. 2<sup>nd</sup> 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 ناقلين آلفا-تالاسمی با استفاده از روش Real-time PCR

سمیه جمالی<sup>۱</sup>، رضا مهدیان<sup>۲</sup>، مینا حیات‌نوسعید<sup>۳</sup>، صادق باباشاه<sup>۴</sup>، فرشته میریمی<sup>۵</sup>، مرتضی کریمی‌پور<sup>۶</sup>، بهناز زربخش<sup>۷</sup>، فائزه رحیمی‌نژاد<sup>۸</sup>، سیروس زینلی<sup>\*</sup>

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

دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱ پذیرش 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 ناشناخته شده آلفا-گلوبین مانند حذف‌های ۴/۲، ۲۰/۵، ۲۳/۷ کیلوبازی و Med PCR را می‌توان با روش 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  $\alpha_1$ ،  $\alpha_2$  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  $16/90 \pm 0.0$  را برای افراد نرمال و نسبت  $15/32 \pm 0.0$  را برای افراد ناقل حذف هتروزیگوت در ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  گلوبین نشان می‌دهد. همچنین آنالیز منحنی ذوب اختصاصی تکثیر ژن‌های مورد نظر را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: روش Real-time PCR روشنی ساده، سریع و مطمئن بوده و می‌توان از آن برای شناسایی حذف‌های ناشناخته در ناقلين 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

معمول ایجاد کننده آلفا-تالاسمی، حذف‌های  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ <sup>4,2</sup> و  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ <sup>3,7</sup>  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ <sup>20,5</sup>  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ <sup>SEA</sup> 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 به علت عدم مشخص بودن دامنه حذف، با استفاده از روش Gap PCR قابل شناسایی نیستند. روش Real-time PCR به عنوان 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 فلورسانست 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 فلورسانست سایبرگرین (SYBR Green-I) I توسعه و بهینه‌سازی یافت و بررسی تعداد نسخه‌های ژنی در ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  در ناقلین‌های آلفا-تالاسمی با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold cycle:  $C_T$ ) که به روش  $\Delta\Delta C_T$ <sup>2</sup> نیز موسوم است، بررسی شد. آستانه نشان‌دهنده میزانی از محصول است که در آن همه نمونه‌ها به صورت تصاعدی تکثیر می‌یابند و  $C_T$  چرخه‌ای است که در آن افزایش معنی‌داری در علامت فلورسانست در طول مرحله تکثیر تصاعدی PCR مشاهده می‌شود. بدیهی است  $C_T$  به طور معکوس با مقدار اولیه DNA ژنومی متناسب است [۹, ۸].

## 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 کمریند 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 فوتیی 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) در ژن بتا-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، به صورت 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 غیرمُؤثرخواهد شد [۱, ۴].

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

جدول ۱ شاخص‌های خون‌شناسی در افراد مطالعه شده

HbF*** (درصد)	HbA2** (درصد)	MCH (پیکوگرم)	MCV (فمتولیتر)	Hb (دسی‌لیتر/گرم)	RBC* (میکرولیتر/ $\times 10^6$ )	تعداد	نمونه
۱/۰۳±۰/۴۵	۲/۹±۰/۸۵	۲۹/۳۶±۰/۹۷	۸۷/۸۹±۱/۹۴	۱۳/۴±۱/۰۶	۴/۵۶±۰/۳۵	۱۵	نرمال
۰/۳۳±۰/۱۱	۲/۲۶±۰/۵۵	۲۰/۹۵±۰/۰۵	۶۹/۵±۱/۶	۱۲/۴۸±۰/۹۹	۷/۲۰±۰/۶۵	۴	هتروزیگوت حذف
۰/۵۲±۰/۲۶	۲/۱۴±۰/۲۴	۲۰/۷۴±۱/۱۲	۶۹/۰۵±۱/۸	۱۳/۵۲±۱/۴۷	۷/۵۲±۰/۴۳	۴	هتروزیگوت حذف ۵/۲۰ کیلو بازی
۰/۳۵±۰/۲۱	۲/۴±۰/۱۴	۲۵/۶۵±۰/۳۵	۷۷/۵±۳/۱۱	۱۳/۹۵±۱/۲	۵/۴۵±۰/۳۵	۱	هتروزیگوت حذف ۲/۴ کیلو بازی
۰/۴۴±۰/۱۸	۲/۴۶±۰/۲۷	۲۵/۳۱±۱/۱۲	۷۹/۳۲±۳/۳۱	۱۳/۲۲±۱/۱۸	۵/۲۷±۰/۵۶	۸	هتروزیگوت حذف ۳/۷ کیلو بازی
۰/۳۲±۰/۰۸	۲/۰۸±۰/۷۱	۲۱/۴۲±۲/۸۴	۷۰/۹۲±۱/۸۷	۱۲/۹۲±۲/۲۸	۷/۲۴±۰/۷۶	۳	هموزیگوت حذف ۳/۷ کیلو بازی
۰/۳۶±۰/۱	۲/۰۰±۰/۳۲	۲۰/۴۳±۱/۰۶	۷۰/۰۵±۳/۲	۱۳/۳۱±۱/۶۷	۵/۶۴±۰/۹۵	۶۰	موارد مشکوک به وقوع حذف

RBC\*: سلول قرمز خونی؛ HbA2\*\*: (α2γ2)؛ HbF\*\*\*: (α2β2)

مقادیر ذکر شده در جدول نمایانگر میانگین ± انحراف از معیار (mean ± SD) است.

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

طول قطعه تکثیری (جفت‌باز)	موقعیت آغازگر بر روی ژن	توالی آغازگر	آغازگر
۱۳۹	III اگزون	۵'-ACGCCTCCCTGGACAAAGTTC-۳'	α <sub>1</sub> - F
۱۳۹	III اگزون	۵'-GGGTACGGGTGCAGGAAGG-۳'	α <sub>1</sub> - R
۱۳۸	III اگزون	۵'-ACGCCTCCCTGGACAAAGTTC-۳'	α <sub>2</sub> - F
۱۳۸	III اگزون	۵'-AGGGCCGGTGCAAGGAG-۳'	α <sub>2</sub> - R
۱۲۸	I ایترون	۵'-CTCTTAGGCCAGGCCTTGTG-۳'	CLCN7- F
۱۲۸	I ایترون	۵'-ACCGTGCTCAGCGCTATGC-۳'	CLCN7- R

## ۲-۲ چندگانه Gap PCR

روش Gap PCR چندگانه برای شناسایی حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی ( $\alpha$ -<sup>۰/۳</sup><sub>۰/۵</sub>،  $\alpha$ -<sup>۴/۲</sup><sub>۴/۰</sub>،  $\alpha$ -<sup>۳/۷</sup><sub>۳/۵</sub> MED) با استفاده از آغازگرهای (Primers) (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 آغازگرهای، ۰/۳ واحد از آنزیم *Taq* پلیمراز و ۲۱ میکرولیتر بافر PCR تهیه شد. واسرتستگی اولیه (Initial Denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت، سپس برنامه تکثیر زیر برای ۳۵ چرخه انجام یافت: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه. همچنین واکنش برای مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ادامه یافت و در انتهای در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهدارشده شد. محصولات PCR روى ژل آگاراز ۰/۸ درصد با آیدیوم بروماید (Ethidium bromide) (Ethidium bromide) (Ethidium bromide) رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از اشعه ماورای بنقش مشاهده شد.

## ۲-۱ انتخاب ناقلین و استخراج DNA ژنومی

تعداد ۶۰ فرد مشکوک به ناقل حذف آلفا-تالاسمی (MCH > MCV، ۸۰ پیکوگرم، ۲۷ فمتولیتر، HbA2 طبیعی یا بیش از ۳/۵ درصد، HbF طبیعی یا بالا و رد قرق آهن) و همچنین ۱۵ ناقل قطعی آلفا-تالاسمی که به کلینیک ویژه تشخیص پیش از تولد انسیتیو 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 گلوبول‌های سفید خون محیطی و با استفاده از روش نمک اشباع (Salting out) [۱۰] انجام و غلظت و کیفیت آن توسط آپکتروفتوомتر NanoDrop® ND-1000 در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. نمونه‌هایی که نسبت A<sub>۲۸۰</sub>/A<sub>۲۶۰</sub> در آن‌ها بیش از ۱/۵ بود، برای آنالیز کمی انتخاب شدند.

پس از محاسبه کارایی بهمنظور استفاده از روش  $\Delta\Delta C_T$ <sup>2</sup>, این بار روش Real-time PCR روی ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  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 ژن  $C_T$  هدف برای هر دو نمونه طبیعی و آزمون از میانگین  $C_T$  ژن مرجع، شاخص  $\Delta C_T$  در نمونه طبیعی و نمونه آزمون محاسبه و از تفاضل دو  $\Delta C_T$  مربوط به نمونه طبیعی و نمونه آزمون، فاکتوری تحت عنوان  $\Delta\Delta C_T$  مطابق فرمول زیر به دست آمد:

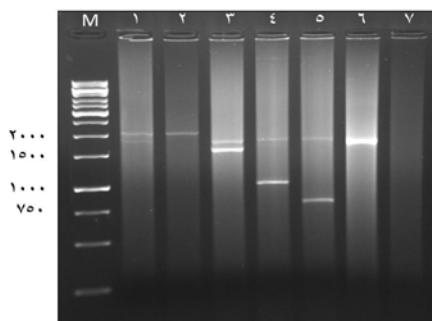
$$\Delta\Delta C_T = [mC_{T_{\text{CLCN7}}} - mC_{T_{\alpha}}] - [mC_{T_{\text{آزمون}}} - mC_{T_{\text{نمونه آزمون}}}]$$

در نهایت تعداد نسخ ژن‌های هدف  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  گلوبین با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta C_T$ <sup>2</sup> مشخص شد [۱۲، ۱۱]. آنالیز داده‌های فوق با استفاده از نرم‌افزارهای SDS نسخه ۱/۲/۳ (Microsoft corp) Excel 2007 (Applied Biosystems, UK) و SPSS نسخه ۱۶ (Chicago, IL, USA) (انجام پذیرفت).

### ۳- نتایج

#### ۱-۳ چندگانه Gap PCR

روش PCR چندگانه امکان شناسایی حذف‌های شناخته شده را به صورت همزمان و در یک واکنش فراهم می‌سازد. با استفاده از این روش وجود حذف‌های شناخته شده  $\alpha_1$ -<sup>4,2</sup>  $\alpha_2$ -<sup>3,7</sup>  $\alpha_1$ -<sup>20,5</sup>  $\alpha_2$ -<sup>20,5</sup> MED--، در ۲۰ فرد کنترل شناسایی شد (شکل ۱).



شکل ۱ شناسایی حذف‌های شناخته شده توسط PCR چندگانه؛ ستون M: شانگر 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.

#### ۳-۲ مخلوط واکنش و برنامه

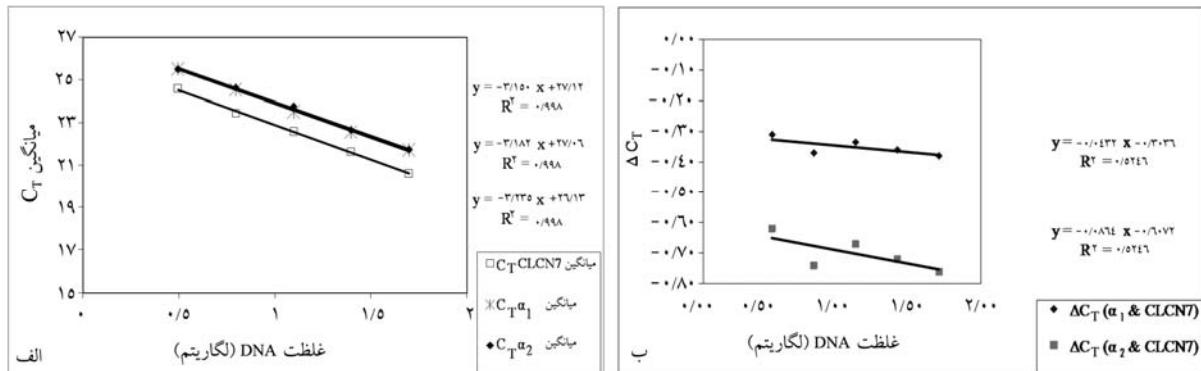
آغازگرهای الیگونوکلتوتیدی برای ژن‌های  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  و همچنین ژن CLCN7 به عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم افزار Primer Express نسخه ۳/۰ (Applied Biosystems, Foster City, CA) تأیید شد. توالی آغازگرهای به کار گرفته شده در این مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

برای هر واکنش مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر مشکل از ۱/۵ میکرولیتر SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, UK) 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 به صورت همزمان انجام و میانگین (C<sub>T</sub>)‌های به دست آمده برای هر ژن محاسبه شد. برای انجام ABI 7300 Sequence Real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) Detection Systems از برنامه زیر استفاده شد: مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد بهمنظور واسرشت‌سازی اولیه DNA الگو در چرخه اول در مدت ۱۰ دقیقه انجام و سپس دو برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت 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.

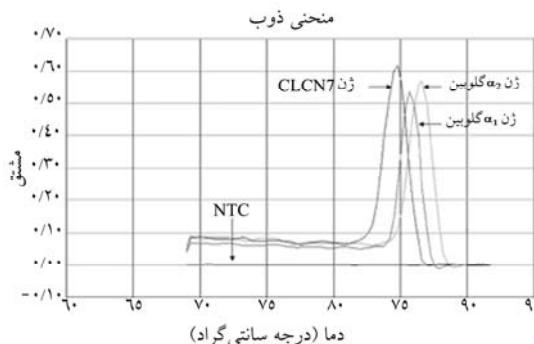
#### ۴- آنالیز اطلاعات با استفاده از روش $\Delta\Delta C_T$

در ابتدا بهمنظور تعیین کارایی تکثیر ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  گلوبین و ژن مرجع CLCN7، به صورت 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:

$$\text{کارایی} = \frac{(\text{شیب})}{10^{-1}}$$



شکل ۲ مراحل بهینه‌سازی Real-time PCR: a) منحنی استاندارد بر پایه سری رقت‌ها از DNA فرد نرمال برای ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  گلووین و CLCN7 به‌منظور محاسبه کارایی؛ b) ارزیابی همزمان شاخص‌های  $\Delta C_T$  برای CLCN7 و  $\alpha_2/\alpha_1/CLCN7$  برای DNA ژنومی؛ معادله خطوط بـه ترتیب  $y = -0.0432x - 0.3036$  و  $y = -0.0864x - 0.06072$  است. همگی خطوط دارای شیب کمتر از ۰/۱ هستند که یک شرط لازم در استفاده از روش C<sub>T</sub> در سنجش‌های Real-time PCR محسوب می‌شود.



شکل ۳ آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  گلووین و ژن مرجع CLCN7؛ هریک از قله‌ها نمایانگر دمای ذوب یک محصول PCR است.

### ۳-۳- شناسایی حذف‌های ژنی آلفا-گلووین توسط Real-time PCR

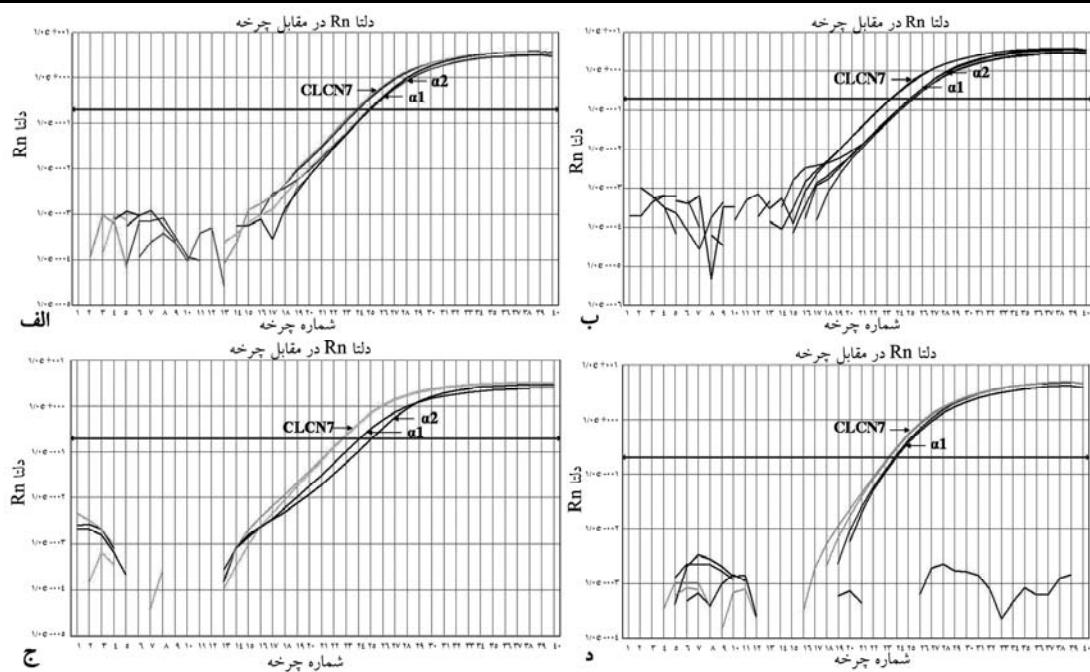
با انجام Real-time PCR برای ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  و CLCN7 در ۶۰ فرد مشکوک به حذف در ژن‌های آلفا-گلووین که هیچ‌کدام از حذف‌های شناخته شده برای آن‌ها شناسایی نشده بود، وجود حذف در ۴۰ نفر بدون هیچ اطلاعی از سرحدات دقیق حذف شناسایی شد. از این تعداد ۱۰ فرد دارای حذف در ژن  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  به صورت همزمان، و ۲۵ فرد دارای حذف در ژن  $\alpha_2$  به صورت هتروزیگوت و ۵ فرد دارای حذف در ژن  $\alpha_1$  به صورت هموزیگوت هستند. همچنین وجود حذف در تمامی ۱۵ نمونه افراد کنترل حذف که وجود حذف شناخته شده در آن‌ها توسط Real-time PCR چندگانه شناسایی شده بود، توسط Gap 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  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  گلووین و ژن مرجع CLCN7 کارایی PCR را برای هر سه ژن تقریباً برابر دانست. شیب به دست آمده از منحنی‌های تکثیر ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  و CLCN7 به ترتیب  $-3/15$ ،  $-3/23$  و  $-0/99$  همبستگی ( $R^2$ ) برای ژن‌های مذکور معادل  $0/99$  است که نشانه وجود هماهنگی بین تغییرات غلظت DNA و اختلاف C<sub>T</sub> است (شکل ۲ a).

همچنین سازگاری و هماهنگی تمامی واکنش‌های PCR به واسطه دامنه وسیعی از غلظت‌های DNA الگوی طبیعی (از ۵۰ تا  $3/13$  نانوگرم در میکرولیتر) با رسم نموداری بر مبنای شاخص‌های  $\Delta C_T$  ژن‌های آلفا-گلووین و CLCN7 در مقابل لگاریتم غلظت DNA ارزیابی شد. شیب  $-0/1$  که این نمودار پس از تعديل شدن ژن هدف توسط ژن مرجع CLCN7 نیز صحت ارزیابی نسبی و روش مقایسه‌ای C<sub>T</sub> را می‌رساند (شکل ۲ b). 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 دائمی است.

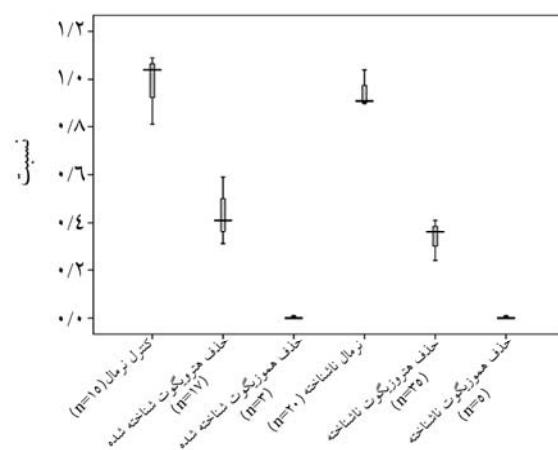


شکل ۴: منحنی تکثیر DNA برای ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  مربوط به فرد سالم؛ ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۴ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده و به آستانه رسیده است. ب: منحنی تکثیر DNA مربوط به فرد ناقل حذف در ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  در چرخه ۲۵ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است. ج: منحنی تکثیر DNA مربوط به حذف هموژیگوت در ژن  $\alpha_1$  در چرخه ۲۵ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است. د: منحنی تکثیر DNA مربوط به حذف هموژیگوت در ژن  $\alpha_2$  در چرخه ۲۴ و ژن مرجع CLCN7 در چرخه ۲۳ وارد مرحله تصاعدی تکثیر شده است. واکنش تکثیر ژن  $\alpha_2$  در فرد هموژیگوت 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 MCH (Mean Corpuscular Volume) MCV (Mean Corpuscular Volume) و HbA2 (Mean Cell Haemoglobin) هستند. در اکثر موارد این افراد سطح HbA2 طبیعی یا نزدیک آستانه هستند ( $3/5$  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 این که 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 می‌تواند 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

مرتبه با تکثیر ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  در فرد ناقل حذف به علت فقدان یک نسخه از ژن هدف، یک چرخه دیرتر از منحنی منتظر در فرد سالم به آستانه رسیده‌اند. محاسبه نسبت  $\Delta\Delta CT$  که در واقع میزان نسبی ژن را در نمونه ناشناخته نسبت به نمونه طبیعی تعیین می‌نماید، نسبت  $0.90 \pm 0.16$  را برای افراد سالم و نسبت  $0.82 \pm 0.15$  را برای افراد ناقل حذف هتروژیگوت در ژن‌های  $\alpha_1$  و  $\alpha_2$  گلوبین نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵ مقایسه نسبت‌های به دست آمده در گروه‌های مختلف

گاما-گلوبین را نیز در گیر کرده باشد یا حتی ارائه نتایج اشتباہ در آزمایش‌های خون‌شناختی (Cell Blood Count: CBC) و تعیین دقیق سطح HbA2 یا فقر آهن می‌توانند از دلایل دیگر قلمداد شوند [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 به کارگیری روش‌های توین وجود حذف در ژن‌های آلفا یا بتا-گلوبین را مشخص و سپس با به کارگیری روش‌های مولکولی دامنه حذف را تشخیص داده و در ادامه برای آن‌ها روش‌های تشخیص سریع و دقیق راه‌اندازی نمود.

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 شب منحنی استاندارد رسم شده برای هر ژن و ضریب همبستگی ( $R^2$ ) خط رسم شده براساس رقت‌های متوالی DNA، باید در محدوده قابل پذیرش (شب منحنی  $3/1$ -تا  $3/6$  و  $95/90 > R^2 >$ ) بوده و در ژن‌های مورد بررسی تا حد امکان یکسان باشند [۲۱، ۱۲].

در تحقیق حاضر تمامی موارد ناقل قطعی که وجود حذف شناخته شده در آن‌ها توسط PCR Gap چندگانه شناختی شده بود، با روش Real-time PCR به درستی 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

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

گاما-گلوبین را نیز در گیر کرده باشد یا حتی ارائه نتایج اشتباہ در آزمایش‌های خون‌شناختی (Cell Blood Count: CBC) و تعیین دقیق سطح HbA2 یا فقر آهن می‌توانند از دلایل دیگر قلمداد شوند [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 به کارگیری روش‌های توین وجود حذف در ژن‌های آلفا یا بتا-گلوبین را مشخص و سپس با به کارگیری روش‌های مولکولی دامنه حذف را تشخیص داده و در ادامه برای آن‌ها روش‌های تشخیص سریع و دقیق راه‌اندازی نمود.

روش Real-time PCR در شناختی بازآرایی‌های ژنی در مورد بیماری‌های متعددی همچون نشانگان ویلیام-برن (Williams-Beuren syndrome) [۱۵]، نشانگان آنجلمن (Angelman syndrome) [۱۶] و بیماری پائیزائوس-مرزباقر (Pelizaeus-Merzbacher) [۱۷] استفاده شده است. همچنین استفاده از این روش در مورد شناختی تعدادی از حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی نیز گزارش شده است [۱۸] که البته روش Gap PCR چندگانه به عنوان روشی مناسب و سریع برای شناختی حذف‌های شناخته شده آلفا-تالاسمی نیز قادر به شناخته شده آلفا-تالاسمی نیز گزارش شده است. بدیهی است این روش توانایی شناختی حذف‌هایی با دامنه نامشخص را ندارد. اخیراً روش کمی تکثیر وابسته به اتصال شناستگرهای چندگانه (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: MLPA) از کاربرد وسیعی در زمینه تشخیص حذف و مضاعف شدگی 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 موئین 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

## ۶- منابع

- [1] Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R. The thalassaemia syndromes. 4<sup>th</sup> 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] Harteveld 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, Saussay P, Ingariola 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 Etiology 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 GreenI and dissociation curve analysis. *Transl Res* 2006; 148(1): 6-12.
- [19] Harteveld 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 پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در دو سال متوالی در شهرستان چابهار

عبدالحسین دلیمی<sup>۱</sup>، فاطمه جالوسیان<sup>۲\*</sup>، سیامک میراب‌سمیعی<sup>۳</sup>، فاطمه غفاری‌فر<sup>۴</sup>، فرامرز سلیمانلو<sup>۵</sup>، رامین نقی‌زاده<sup>۶</sup>

- ۱- استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه انگل شناسی، 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 انگل شناسی، 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: ۸۷/۱۱/۲۰ پذیرش مقاله: ۸۷/۸/۵

### چکیده

هدف: مقاومت دارویی پلاسمودیوم فالسی‌پاروم نسبت به کلروکین مشکل اصلی در مناطق مalariaخیز است. وجود ارتباط بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های *pfmdr1* و *pfCRT* پلاسمودیوم 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 *pfCRT* با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد. مواد و روش‌ها: بدین منظور ۲۶ نمونه خون از افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم و مقاوم به کلروکین از بندر چابهار در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. این جهش‌ها با استفاده از روش Light CyclerTM و پروب‌های دورگه‌سازی شناسایی شدند.

نتایج: طبق نتایج این مطالعه در کدون ۸۶ ژن *pfmdr1* تعداد ۶ نمونه (۲۲ 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 در کدون *pfCRT* در کدون *pfmdr1* در ۱۱ نمونه‌ها و در کدون‌های CVMNT و CVIET در ۷ (۲۷٪) درصد نمونه‌ها، تنها در دو نمونه (۷٪ درصد) و SVMNT در ۵ نمونه (۱۹٪) مشاهده شد.

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

**کلیدواژگان:** پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین، ایران، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، *pfmdr1*، *pfCRT*

### ۱ - مقدمه

مالاریا (Malaria) یک بیماری انگلی و یکی از مسائل مهم بهدشتی تعدادی از کشورهای مناطق گرمسیری دنیا و از جمله ناتوانی باعث اتلاف نیروی کار شده و بر وضعیت اقتصادی و

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

Email: Jalousian\_f@yahoo.com

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 به طور 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 فلورستی وابسته است که علائم (Signals) این آشکارگر فلورستی نسبت مستقیمی با مقدار محصول PCR در واکنش دارد. در نتیجه این روش یک سیستم قوی برای تعیین ژنوتیپ SNPs به شمار می‌آید. با توجه به این که برای تعیین جهش‌های احتمالی در ژن‌های پلاسمودیوم فالسی‌پاروم تاکنون در ایران فقط مطالعه محدودی 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 *pfcrt* و *pfmdr1* پلاسمودیوم Real-time PCR فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین با استفاده از روش PCR بوده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۱-۲- جمع‌آوری نمونه

۲۶ نمونه خون افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم در شهرستان چابهار که آلدگی 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

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 شیوه این بیماری، مقاومت دارویی پلاسمودیوم فالسی‌پاروم (*Plasmodium falciparum*) نسبت به کلروکین (Chloroquine) گزارش شده است. مقاومت دارویی در پلاسمودیوم فالسی‌پاروم به معنی توانایی سویه انگل در زنده ماندن و تکثیر در حضور غلظت‌هایی از داروست که به طور 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 درین (in vitro) و آزمایشگاهی (in vivo) نسبت به تعدادی از داروهای ضد مalaria به خصوص 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 به ترتیب در سال‌های ۹۳-۱۹۹۰ و سپس ۹۶-۱۹۹۴ در هر سه استان هرمزگان، سیستان و بلوچستان و کرمان انجام گرفت به ترتیب ۷۳/۴ درصد و ۶۰/۲ درصد موارد نسبت به کلروکین مقاوم بودند [۳].

تحقیقات محققان در کشورهای مalariaخیز 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 *pfcrt* و *pfmdr1* به جای 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 به همین دلیل

میگیرند و پدیده انتقال انرژی رزونانس فلورسنس (Florescence Resonance Energy Transfer: FRET) بین آنها رخ می‌دهد [۵].

برای کدون ۸۶ و ۱۸۴، برنامه PCR به این شرح بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ دقیقه و ۳۵ چرخه؛ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و با برنامه ذوب ۷۵-۳۵ 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 به مدت ۹ دقیقه و ۴۰ چرخه؛ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه و با برنامه ذوب ۸۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد و TTR ۰/۲ درجه در ثانیه ادامه یافت.

#### ۴-۴- تعیین جهش‌های *Pfcrt*

برای تعیین جهش‌های ژن *pfcrt* آغازگر پایین دست در انتهای ۳' با ۶۴۰ Light Cycler red نشاندار شده که به عنوان پروب آنکور است، طی مراحل تکثیر، این آغازگر (که آغازگر برگشت است) طویل می‌شود و پدیده FRET بین پروب حسگر و محصول PCR که به عنوان پروب آنکور است رخ می‌دهد [۵].

سپس 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 [۵].

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

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

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 آلوه ساکن چابهار جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها با استفاده از کیت QIAamp DNA minikit (QIAGEN) استخراج شد.

#### ۴-۲- سویه‌های مرجع پلاسمودیوم فالسی‌پاروم

سه سویه پلاسمودیوم فالسی‌پاروم که حساسیت و مقاومت آنها به کلروکین تعیین شده بود به عنوان مرجع انتخاب شدند. سویه ۳D7 حساس به کلروکین است (از هلند است) و سویه‌های W2 و 7G8 مقاوم به کلروکین هستند (سویه ۷G8 از جنوب شرق آسیا و ۷G8 از بزرگیل است). این سویه‌ها از محیط کشت برداشته و به صورت نقطه‌گذاری شده روی کاغذ واتمن توسط دی‌مونبریسون (de Monbrison) از فرانسه ارسال شدند.

#### ۳-۲- تعیین جهش‌های *pfmdr1*

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

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

پروب حسگر (Sensor probe)، در انتهای ۳' با فلورسین (Sensor probe)، در انتهای ۳' با فلورسین نشاندار شده است و برای تشخیص ناحیه دارای جهش طراحی شده است. پروب آنکور (Anchor probe)، در انتهای ۵' با Light Cycler Red 640 نشاندار شده است و در انتهای ۳' فسفوریله شده است تا از طویل شدن توسط آنزیم تک پلیمراز جلوگیری شود، این پروب برای اتصال به ناحیه مجاور با ناحیه دارای DNA یافته طراحی شده است. هر دو پروب روی یک رشته متصل می‌شوند و دو تا رنگ فلورسنت در مجاورت هم‌دیگر قرار

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

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

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

\* در این کدون جهش K76T مشاهده نشد.

منحنی های تجزیه و تحلیل دمای ذوب نمونه های خون آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم و سویه های مرجع برای تشخیص جهش K76T ژن *pfCRT* 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 آن ها  $43/7 \pm 0/2$  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 می توان به طور بالقوه به روشی قوی و کاربردی برای تشخیص SNPs در دو ژن *PfCRT* و *PfMDR1* پلاسمودیوم فالسی‌پاروم دست یافت. این روش در یک سیستم کاملاً بسته انجام شده و نمونه ها بدون آلودگی قابل استفاده برای انجام روش های دیگر هستند. در این روش برای خواندن نتایج به الکتروفورز پس از PCR نیازی نیست بنابراین نتایج سریع تر خوانده می شود 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 به عنوان الگو و کنترل منفی فاقد الگو (No Template Control: NTC)) در کنار سایر نمونه ها قرار داده شد. به منظور بررسی قابلیت تکرار پذیری روش، سویه های مرجع و نمونه ها هر کدام چهار بار با Light Cycler آزمایش و دمای ذوب آنها تعیین شد. نتایج به صورت میانگین دمای ذوب  $\pm$  دو برابر انحراف معیار (2SD) نشان داده شد.

## ۳- نتایج

پروب های دورگه سازی و تکنولوژی Light Cycler برای تشخیص جهش های نقطه ای در ژن های *pfCRT* و *pfMDR1* در مقایسه با سه سویه مرجع ارزیابی شدند. این سویه ها با آغازگرهای اختصاصی برای ژن *pfCRT* و *pfMDR1* تکثیر شدند و تجزیه و تحلیل منحنی دمای ذوب هم انجام شد.

طبق نتایج جدول ۱، در کدون ۸۶ تعداد ۶ نمونه (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 جهش های *pfMDR1* در میان ۲۶ نمونه خون افراد آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در چابهار

کدون ها		نمونه ها
۱۲۴/۶	۱۰۴/۲	
۱۸۴	۸۶	
جهش یافته (درصد) تعداد	جهش یافته (درصد) تعداد	جهش یافته (درصد) تعداد
۲۶ (۱۰۰)	۰ (۰)	۲۰ (۷۷)
۷ (۱۰۰)	۰ (۰)	۷ (۱۰۰)
۱۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۱۳ (۶۷/۵)
		۶ (۳۱/۵)

طبق نتایج جدول ۲، جهش K76T در هایپلوتیپ CVMNT در *pfCRT* در (۴۲/۳) ۱۱ نمونه و هایپلوتیپ های CVIET در ۷ (۲۷/۹) درصد نمونه، و SVMNT در ۵ نمونه (۱۹/۲) مشاهده شد. این جهش تنها در یک نمونه (۳/۸) 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* N86Y را نشان داد.

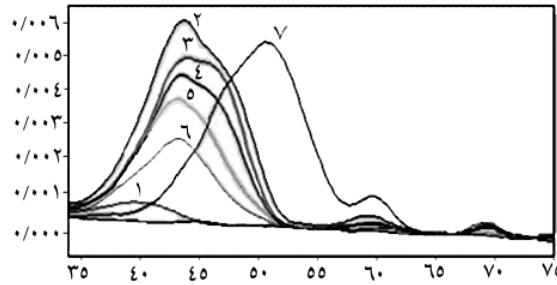
در هر دو سال در هیچ کدام از نمونه‌ها در جایگاه اسیدهای آمینه ۱۸۴، ۱۰۳۴، ۱۰۴۲ و ۱۲۴۶ ژن *pfmdrl* جهشی مشاهده نشد. در مطالعه یورسین (Ursin) و همکاران (۲۰۰۶) نیز که با استفاده از روش PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment length polymorphism) در منطقه چابهار انجام شده بود، جهشی در جایگاه‌های اسیدهای آمینه کدون‌های ۱۸۴، ۱۰۳۴، ۱۰۴۲ و ۱۲۴۶ یافت نشد. در مطالعه یورسین و همکاران (۲۰۰۶) حذف اسیدآمینه جایگاه ۷۵ گزارش نشده و همچنین الل‌های جهش یافته جایگاه‌های ۷۴، ۷۵ و ۷۶ تواماً گزارش نشده است [۶]. در مطالعه اسماعیلی (Esmaeili) 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 *pfcrt* 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 SVMNT و CVIET در ژن *pfcrt* با مقاومت به ۴ آمینوکیتونین‌ها مرتبط شمرده شده است [۹]. هاپلوتیپ‌های ژن *pfcrt* در چابهار، جنوب شرقی ایران، مشابه هاپلوتیپ‌های CVIET در جنوب شرق آسیا و SVMNT در هند است، که تأییدی بر نظریه گسترش جهانی پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین است.

در این مطالعه جهش K76T در ژن *pfcrt* بیشترین فراوانی را داشت در مطالعاتی که روی چندشکلی‌های ژنی انجام می‌شود، جهش K76T در ژن *pfcrt* 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].

غلب مطالعات مولکولی پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین روی چندشکلی‌های موجود در دو ژن *pfcrt* و *pfmdrl* متصرکزاست. ژن *pfcrt* روی کروموزوم ۷ قرار دارد و *pfmdrl* پروتئین‌های انتقالی غشاء واکوئل را کد می‌کند. ژن *pfmdrl* روی کروموزوم ۵ قرار دارد و pGlycoprotein Homologue 1: PGH1 (P-Glycoprotein Homologue 1: PGH1) را کد می‌کند [۵].



شکل ۱ منحنی‌های تجزیه و تحلیل دمای ذوب نمونه‌های خون آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین در چابهار و سویه‌های مرتع برای تشخیص جهش K76T ژن *pfcrt*. به ترتیب: از چپ به راست: ۱- منحنی 3D7 (سویه حساس)، ۲- 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 مولتی‌ژنتیک است و انجام مطالعه هم‌مان بر دو ژن *pfmdrl* و *pfcrt* نتایج بهتری ارائه می‌دهد [۸]؛ از طرفی در این ۷ نمونه، جهش‌های تک نوکلئوتیدی در ژن *pfcrt* مشاهده شد. بدین ترتیب که در ۵ (۷۱/۴ درصد) نمونه جهش در هاپلوتیپ CVMNT، 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 *pfcrt* ۶ (۳۱/۶ درصد) نمونه در هاپلوتیپ CVMNT و در ژن *pfcrt* ۶ (۳۱/۶ درصد) نمونه در هاپلوتیپ CVIET دیده شد. ۶ (۳۱/۶ درصد) نمونه در هاپلوتیپ CVMNT ۲۱ (۱۰/۵ درصد) نمونه در هاپلوتیپ SVMNT و ۲ (۱۰/۵ درصد)

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

## ۵- تشكير و قدردانی

نویسنده‌گان مقاله مراتب تشكير و قدردانی خود را از دکتر مونبریسون با بت اهدای سویه‌های مرجع پلاسمودیوم فالسی‌پاروم از فرانسه و از مرکز تحقیقات دانشگاه تربیت مدرس در چاههار بت همکاری در جمع آوری نمونه خون‌های آلوده به پلاسمودیوم فالسی‌پاروم مقاوم به کلروکین اعلام می‌دارند.

وجود دارد [۱۳]. به نظر می‌رسد که چندشکلی‌های ژن *pfCRT* 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 خد مalaria حذف کرده‌اند شیوع جهش K76T نیز در آن کشور کاوش یافته است [۱۴].

از طرفی مطالعاتی که روی SNPs ژن *pfdmrl* 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 تنها یکی برای مقاوم شدن به کلروکین کافی نیست [۹-۱۶]. بنابراین مطالعه همزمان جهش‌های دو ژن *pfdmrl* و *pfCRT* نتایج بهتری ارائه می‌دهد. مطالعات دیگری نشان داده است که جهش N86Y باعث افزایش حساسیت به مفلوکین (Mefloquine) و آرتمنیسین (Artemisinin) می‌شود و این مطلب باید در درمان دارویی در مناطق بومی در نظر گرفته شود [۲۱].

## ۶- منابع

- [1] Azizi F. Epidemiology and control of common diseases in Iran. 1<sup>st</sup> ed 2001. Tehran Eshtiagh publisher. (Persian)
- [2] Edrisian 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 Irm 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 pfdmrl-

- pfcrt 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 pfcrt, 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, Mohebali M. Detection of K76T mutation in pfcrt 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 pfcrt 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 (pfcrt) 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 pfcrt 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. Pfcrt 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 (pfcrt) 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, Puijalon 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] Wellemes 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, Hongvangthong 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<sup>۱\*</sup>، مهدی بنان<sup>۲</sup>، علی محمد اصغریان<sup>۳</sup>، جلال قره سوران<sup>۴</sup>، حسین نجم آبادی<sup>۵</sup>

- 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 تکاب، مازندران، ایران
- ۴- مریم، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۵- استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۲۸  
پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۲۷

### چکیده

هدف: پروتئین CREB یک فاکتور مهم پایین دست بسیاری از مسیرهای علامتی به شمار می‌رود. با طراحی siRNA کارامد 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 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 مهاری بیان ژن CREB با استفاده از PCR Real-time کمی-نسی انجام گرفت.

نتایج: طبق نتایج به دست آمده یکی از siRNAها اثر مهاری بالایی بر روی بیان CREB در سلول‌های K562 نشان داد، و بیان ژن CREB در سلول‌های K562 کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از PCR Real-time نشان داد که از دو siRNA به کار رفته در سلول‌های K562 مهار ژن CREB1، فقط یکی از آن‌ها قدرت مهاری با کارایی بالا را دارد. با توجه به این که هر دو siRNA با معیارهای Reynolds است، احتمالاً عوامل دیگری هم در مؤثر بودن siRNA درخالت دارند. برای مهار کارامد 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

مولکول‌های (small interfering RNA) siRNA یکی از مهم‌ترین و مؤثرترین راه‌های خاموش‌سازی ژن‌های سلول‌های جانوری است [۱-۳]. siRNA، قطعات اجزای عملکردی مسیر RNAi (RNA interference) هستند،

\* نشانی مکاتبه: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی  
Email: zdeilami@yahoo.com

تحقیق طراحی CREB1 siRNA و بررسی دقیق میزان مهاری 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 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

### ۱-۱- کشت سلول

سلول‌های K562 از بخش سلولی، دانشگاه هلنند تهیه شدند. سلول‌ها در محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Biosera) همراه با (Fetal Bovine Serum) FBS (Biosera) در انکوباتور با ۵ درصد  $\text{CO}_2$  و ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند تا به تعداد  $10^7$  در هر میلی لیتر 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 به طور کارامد 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 به صورت ۳' AGGUAGUGUAAUCGCCUUG ۵' بود که از شرکت MWG تهیه شد.

نوکلئوتیدی هستند و بیان ژن‌ها را در مرحله پس از رونویسی مهار می‌کنند. برای خاموش‌سازی ژن، siRNA با مجموعه‌های خاموش‌کننده (RNA-Induced Silencing Complex) RISC یا RNA با انتقال به RNA هدف موجب تجزیه آن می‌شوند [۱]. این سیستم به طور 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].

(Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element binding protein) CREB از فاکتورهای رونویسی است که فعالیت آن در پاسخ به بسیاری از محرک‌های سلولی مثل Ca<sup>2+</sup>, cAMP, هیپوکسی، نور ماورای بنفس (Ultra Violet: UV) و فاکتورهای رشد افزایش می‌یابد. مطالعات اخیر در موش‌های ترانس‌ژنیک 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 [۶]. با توجه به موارد گفته شده پروتئین CREB1 ممکن در مسیرهای علامتی اکثر فرایندهای سلولی نقش داشته باشد. برای 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. هر کدام 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 اریتروblastی آن‌ها مدل سلولی مناسبی برای مطالعات مسیرهای علامتی تنظیم تولید هموگلوبین هستند [۷]. هدف از این

## ۴- رنگ آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده با pSV- $\beta$ -Galactosidase

رنگ آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده با pSV- $\beta$ -Gal با استفاده از کیت  $\beta$ -Gal Staining Set (Roche) انجام گرفت. این کیت متشکل از بافر حاوی آهن (Iron buffer) (Roche) (Iron) و (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -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 فرمالدھید ۳۷ درصد در ۹۳۸ میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) اضافه شده و در بن‌ماری دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم می‌شود. برای تهیه محلول رنگ آمیزی (Staining) ۱ واحد از X-gal در ۱۹ واحد Iron buffer رفیق شده و به مدت ۱۰ دقیقه کاملاً محلوط شد.

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

## ۵- استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA CREB1 و منفی با روش RNX انجام شد. رسوب سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر 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 ۱۳۰۰۰ rpm 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'	(Sense) (Antisense)	siRNA نوالی فائد اثر مهاری آنتی سنس بيان زن CREB
5' GGUGGAAAUGGACUGGCC tt3' 3' CCACCUUUACCUGACCGA 5'	سنس آنتی سنس	siRNA توالی فائد اثر مهاری آنتی سنس بالا بيان زن CREB

## ۳-۲- ترانسفکشن (Transfection) سلول‌ها

هر دو نوع siRNA ژن CREB1 با استفاده روشن لیوفکشن (Lipofection) به داخل سلول‌های K562 ترانسفکت شدند. برای مطالعه علاوه بر siRNA هدف، siRNA منفی نیز با توالی ۳' AGGUAGUGUAUCGCCUUG ۵' استفاده شد. این siRNA با هیچ mRNA رابطه مکملی نداشته و بنابراین روی بیان هیچ ژنی را تأثیر نمی‌گذارد. برای هر نمونه کمپلکس لیوفکتامین (Lipofectamine™ 2000) به شرح ذیل آماده شد: مقدار ۱۰۰ پیکومولار از siRNA در ۱۰۰ میکرولیتر RPMI بدون سرمه، رفیق شده و به آرامی چند بار محلوط می‌شود. مقدار ۲ میکرولیتر از لیوفکتامین (Invitrogen) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI بدون سرمه محلوط شده و ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ترکیب siRNA و لیوفکتامین رفیق شده با یکدیگر محلوط 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 CO<sub>2</sub> درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند [۱۰]. برای کنترل کارایی ترانسفکشن، در کنار سلول‌های ترانسفکت شده با CREB1 siRNA چاهک‌های جداگانه با همان شرایط ترانسفکشن پلاسمید pSV- $\beta$ -Galactosidase نیز به داخل سلول‌ها ترانسفکت شدند. در صورت وارد شدن پلاسمید به سلول‌ها، بیان  $\beta$ -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 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.

کاملاً مخلوط و سپس در دور ۱۳۰۰۰ rpm 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 ستر cDNA با استفاده از کیت RT-PCR (Bioneer) به کار رفت.

## ۶-۲- بررسی اثر مهاری siRNA

به منظور بررسی میزان مهار ژن CREB1 از کیت QIAGEN QuantiFast SYBR Green (ABI-7500 Real-time PCR) 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) (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) GAPDH به عنوان کنترل داخلی مقایسه شد؛ سپس از فرمول زیر برای محاسبه بیان ژن استفاده شد [۱۱، ۱۲]:

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

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

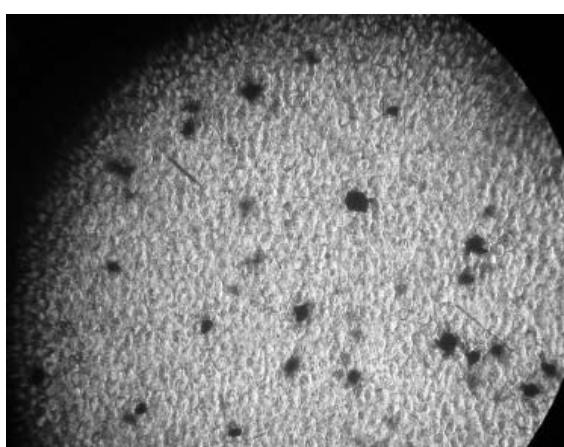
$2\Delta\Delta C_T = 2(\Delta CREB - \Delta GAPDH)$   
توالی آغازگری ژن GAPDH (کنترل داخلی) و  
که از سایت اینترنتی Primer Bank طراحی شد، به صورت زیر است:

5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'	-GAPDH جلویی
5'-GTTGCTGTAGCCAAATTGTTGT-3'	-آغازگر GAPDH برگشتی
5'-CACCTGCCATCACCACGTAA-3'	-آغازگر جلویی CREB
5'-GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT-3'	-آغازگر CREB برگشتی

دما و شرایط انجام Real-time PCR به صورت زیر بود:  
گرمادهی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه که طی این مرحله *Taq* پلیمراز شروع داغ (Hot start *Taq* polymerase) 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 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 کمتر نیز مشاهده شد که نشان دهنده آن است که این سلول‌ها ترانسفکت شده‌اند و در مقایسه با سلول‌های پرنگ 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 siRNA‌های سلول K562 ترانسفکت شده با

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

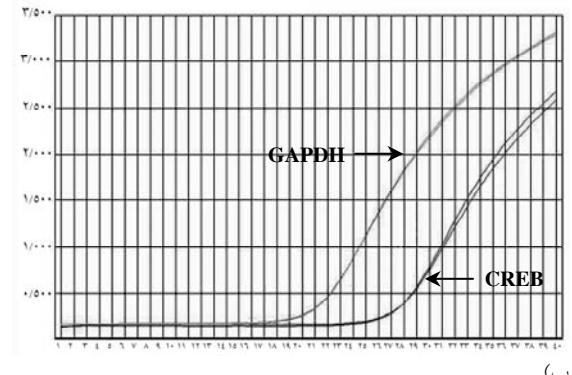
#### ۴- بحث

فعالیت‌های سلول به وسیله مسیرهای علامتی هدایت می‌شود و شناسایی ژن‌های پایین‌دست 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 siRNA استفاده شده است که به دنبال آن چندین ژن درگیر در این مسیرها نیز شناسایی شده‌اند [۱۳، ۱۴].

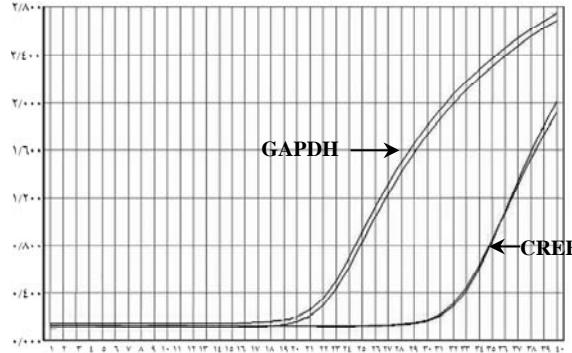
در این تحقیق دو siRNA برای مهار بیان ژن CREB1 در سلول‌های K562 بر طبق معیارهای Reynolds به کار گرفته شد و با توجه به این که دو توالی siRNA طراحی شده از امتیاز بالایی برخوردار بودند، با این حال تنها siRNA ای که به توالی ۱۲۳۵-۱۲۵۲ متصل می‌شد، با کارایی بالا توانست ژن CREB1 را در سلول‌های اریترولوکمیای 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 انتهایی ۵' 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 CREB1 siRNA که در این تحقیق استفاده شد، siRNA که اثر مهاری از خود نشان نداد، در هر دو انتهای دارای

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

(الف)



(ب)



شکل ۲ منحنی‌های مربوط مهار ژن CREB1 در سلول‌های K562 است. الف: منحنی مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA و ب: منحنی مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA: محور افقی مربوط به تعداد پرخنچه‌های PCR و محور عمودی مربوط به میزان افزایش فلورسانس سایبرگرین است. CT K562 ترانسفکت شده با ژن siRNA منفی در رابطه با ژن GAPDH و ژن CREB1 مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با CREB1 siRNA در مورد ژن GAPDH و ژن CREB1 است. میزان مهاری ژن CREB با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta CT$  محاسبه شد.

نتایج مربوط به CREB1 siRNA اول، اثر بازدارنده‌گی مؤثری نشان نداده و CREB1 siRNA دوم اثر مهاری ۸۷ درصد را در سلول K562 نشان داد.

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

پروتئین CREB1 به عنوان یک فاکتور رونویسی می‌تواند در پایین دست اکثر مسیرهای علامتی درون سلولی و مسیر علامتی بسیاری از داروها در فعل کردن بیان ژن‌های خاص نقش داشته باشد. [۱۶]

به این ترتیب طراحی یک siRNA کارامد و مطمئن برای CREB1، می‌تواند 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 انتهای متصل شود. در حالی که در مورد CREB siRNA دوم با اثر مهاری بالا، یکی از انتهایها دارای جفت باز G≡C و انتهای دیگر دارای جفت باز U=A است. به این ترتیب اتصال RISC با انتهای 5' رشته آنتی‌سنس صورت گرفته و این siRNA به طور کارامد توانسته با mRNA متصل شده و اثر مهاری را در بیان ژن CREB1 در مرحله قبل از ترجمه انجام دهد. به نظر می‌رسد برای استفاده از siRNA در مطالعه عملکرد ژن خاص، طراحی چند مولکول siRNA با هم و همزمان برای قسمت‌های 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. *Biootechnol 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, Sjögren 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-Acquach 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.



## راه‌اندازی آزمایش الایزا برای تعیین عیار آنتی‌بادی ضد ویروس هرپس سیمپلکس نوع یک و مقایسه نتایج با روش خنثی‌سازی ویروس

کبرا رضوی‌پاشاییگ<sup>۱</sup>، حوریه سلیمان‌جاهی<sup>۲\*</sup>، یاشار محمدزاده‌صدیق<sup>۱</sup>، محمدحسن روستایی<sup>۳</sup>

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

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

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

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۲۰

### چکیده

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

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ابتدا ویروس‌های هرپس سیمپلکس در سلول‌های BK تکثیر یافت و عیار آنتی‌بادی‌ها علیه ویروس هرپس سیمپلکس در ۵۰۲ نمونه جمع آوری شده با آزمون خنثی‌سازی ویروس به عنوان استاندارد طلایی و الایزا طراحی شده تعیین شد.

نتایج: براساس نتایج بدست آمده به ترتیب ۸۰/۴۸ و ۸۱/۶۷ درصد عیار بیش از ۱/۸ در آزمون خنثی‌سازی ویروس و الایزا داشتند ضریب پیرسون بین متغیرهای مورد بررسی ۰/۹۶ محاسبه شد که نشان‌دهنده ارتباط معنی دار و نزدیک بین متغیرهای مورد بررسی فوق می‌باشد (ضریب پیرسون=۰/۹۶).

نتیجه‌گیری: اطلاعات بدست آمده نشان داد که آزمون الایزا طراحی شده می‌تواند برای غربالگری و بررسی شیوع آنتی‌بادی‌های ضد هرپس سیمپلکس نوع ۱ استفاده شود که بدنوبه خود در سازماندهی بیماران خاص برای درمان با به کارگیری روش‌های آزمایشگاهی کم هزینه و مناسب مؤثر است.

کلیدواژگان: ویروس‌های هرپس سیمپلکس، خنثی‌سازی ویروس، آزمون الایزا

### ۱ - مقدمه

ارگان‌های تناسلی و همچنین شایع‌ترین علت آنسفالیت تک‌گیر در ایالات متحده است [۱، ۳]. آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) ADCC پاسخ‌های واپسی به کمپلمان، ۲ تا ۶ هفته پس از عفونت ظاهر می‌شوند و مادام‌العمر باقی می‌مانند [۴]. این ویروس گسترش وسیعی در طبیعت و جوامع مختلف انسانی دارد [۲، ۳] در اثر

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

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

Email: Soleim\_h@modares.ac.ir

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

برای انجام این آزمون ابتدا تک لایه‌ای از سلول‌های BK در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (NUNC) با محیط کشت DMEM آماده شد، نمونه‌های سرمی تحت مطالعه به‌مدت نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌منظور حذف عوامل کمپلمان حرارت داده شدند، سپس رقت‌های متواالی سرم (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸، ۱/۲۵۶، ۱/۵۱۲) در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای محتوی محیط کشت فاقد سرم تهیه شد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروسی با رقت  $10^{-5.75}$  (معادل  $100 \text{ TCID}_{50}$  ذره ویروسی) بود، به حجم مساوی از رقت‌های تهیه شده نمونه‌های سرمی اضافه و میکروپلیت به‌مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا واکنش بین آنتی‌بادی‌های 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 سانتی‌گراد قرار داده شد تا اگر ویروس خنثی نشده‌ای موجود باشد جذب سلول‌ها شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و دوباره به گرمانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. نتایج آثار تخریب (Cytopathic effect: CPE) بعد از ۲۴ ساعت بررسی و ثبت شد. عیار آنتی‌بادی موجود در نمونه‌های سرمی برابر با بالاترین رقت سرمی است که بتواند مانع از فعالیت ویروس در کشت سلول و بروز CPE شود محاسبه شد.<sup>[۳]</sup>

سپس آزمون VNT به‌عنوان استاندارد طلایی برای طراحی ELISA مورد استفاده قرار گرفت که به روش غیررقابتی و غیرمستقیم با ویروس کامل راهاندازی شد. برای استاندارد کردن این آزمون از روش چکر بورد (Cheker Bord) به ترتیب زیر استفاده شد:

- ۱- در ابتدا رقت‌های حاوی ۱ و ۵ و ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن [سوسپانسیون ویروس HSV-1

تکثیر ویروس در کشت یاخته آثار تخریب ناشی از آن شامل بالونی شدن یاخته‌های آلوده، تولید انکلوژن بادی‌های (Inclusion bodies) داخل هسته‌ای، تشکیل یاخته‌های غول پیکر چندهسته‌ای، حاشیه‌نشینی کروماتین دیده می‌شود. با وجود این که عفونت‌های ویروس هرپس در تمام نقاط جهان گسترده‌گی دارند اما در کشورهای در حال توسعه به دلیل سطح پایین بهداشت، دارای شیوع بسیار بالایی هستند<sup>[۵]</sup>. با توجه به افزایش روزافزون عفونت‌های هرپسی در دستگاه تناسلی و به دنبال آن عفونت‌های هرپسی نوزادان و این که این ویروس در نوزادان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی معمولاً بیماری کشنده ایجاد می‌کند و تشخیص به موقع و درمان می‌تواند از تعداد مرگ و میر بکاهد<sup>[۱، ۵]</sup>، بنابراین طراحی روشنی سریع و حساس و مقرن به صرفه برای تشخیص عفونت و نیز به‌عنوان آزمون مناسب برای غربالگری در جامعه در معرض خطر "نوزادان، سالمدان و افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف شده" به‌منظور سازماندهی درمان، مورد نیاز است. بدین منظور از بین روش‌های تشخیص سرولوژیکی این ویروس، آزمایش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) و آزمایش خنثی‌سازی ویروس (Virus Neutralization Test: VNT) آراماندازی و با هم مقایسه شدند.

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

## ۲- مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا ویروس HSV-1 در سلول‌های BK (R\_Kh\_BK) (تیره یاخته‌های رازی- خدمتی) با محیط (Dulbecco's Modified Eagles Medium) DMEM (Spearman-Karber) تکثیر شد و به روش اسپرمن- کاربر (TCID<sub>50</sub>) در میلی‌لیتر تعیین شد. آزمایش VNT به روش رقت ثابت ویروس- رقت متغیر سرم (Constant Virus-Varying Serum Dilutions) برای تعیین عیار آنتی‌بادی‌ها علیه HSV-1 در ۵۰۲ نمونه پلاسمای

آنتی ژن باشند و برای هر رقت ۲ چاهک برای پرهیز از خطای احتمالی درنظر گرفته شد. لازم به ذکر است که برای کنترل نمودن نمونه‌های سرم مثبت و منفی ۲ میکروپلیت جداگانه حاوی آنتی ژن ویروسی تهیه و به طور جداگانه ارزیابی شد و پلیت‌ها به مدت یک و نیم ساعت در گرماخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند؛

۶- مرحله شستشو ۴ بار تکرار شد؛

۷- آنتی‌بادی کونژوگه با پراکسیداز (Horse Radish Peroxidase: HRP) با رقت ۱/۱۵۰۰، ۱/۳۰۰۰، ۱/۴۰۰۰ بازگشایی کرد. طوری به چاهک‌ها افزوده شد که هر رقتی از آنتی ژن و سرم در مقابل با هر سه رقت از رقت‌های آنتی‌بادی ثانویه قرار گیرد و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمگذاری شد؛

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

۹- به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا کروموزن (Chromoden)، تترامیتل بنزیدین (TMB) اضافه شد و به مدت ۱۰ 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 Reader) در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت شد؛

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

بالاترین رقت آنتی ژن که بیشترین اختلاف را در جذب نمونه‌های پلاسمای مثبت و منفی در مقایسه با کنترل منفی آنتی ژن 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 آنتی ژن آزمایش با سرم‌های استاندارد تعیین عیار شده انجام گرفت و بنابراین رقت ۱/۵۰۰۰ از آنتی‌بادی اولیه (سرم افراد تحت آزمایش) و رقت ۱/۴۰۰۰ از آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti human IgG conjugated with HRP) و

تعیین غلظت شده با برادفورد (Bradford)، با بافر (bafer) ۱۰ میلی‌مolar فسفات سالین با pH= ۷/۸-۷ (pH= ۷/۸-۷) 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 ۰/۱ ELISA درصد آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albomin) BSA اضافه شد. این بافر برای رقیق کردن آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به کار می‌رود) تهیه شد. سپس از هر رقت آنتی ژن به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در ۲ چاهک میکروپلیت مخصوص (NUNC) ELISA ریخته شد و میکروپلیت به مدت ۱۴ ساعت در گرماخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. این عمل برای اتصال (Coating) آنتی ژن به کف چاهک میکروپلیت صورت گرفت. در این مرحله به ازای هر چاهک واحد آنتی ژن ویروسی یک چاهک به عنوان کنترل منفی آنتی ژن در نظر گرفته شد که در آن محیط کشت جمع‌آوری شده از روی سلول‌های BK غیرآلوده به ویروس ریخته شد؛

۲- پس از گرمگذاری ذکر شده میکروپلیت‌ها از گرماخانه خارج شده و تمامی چاهک‌ها در شرایط یکسان توسط بافر شستشو (باfer NaCl فاقد ELISA که دارای توهین 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 باfer ELISA حل شد) به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و به مدت یک ساعت میکروپلیت در گرماخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. این مرحله بدین منظور انجام شد که نفاطی از کف چاهک‌ها، که هیچ‌گونه آنتی ژن 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 گرماخانه ۳۷ درجه سانتی گراد 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

- دور از نور نگهداری شد؛
- ۱۰- برای متوقف کردن واکنش رنگ‌زایی، ۵۰ میکرولیتر اسید‌سولفوریک ۲ مولار به چاهک‌ها افزوده شد؛
- ۱۱- نتایج توسط دستگاه قرائت‌گر 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 آن‌ها برابر با ۰/۴ شد که به عنوان سطح حداقل در نظر گرفته شد [۸-۶].

### ۳- نتایج

در آزمایش VNT نمونه‌هایی که عیار آنتی‌بادی 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 آنتی‌بادی در نمونه‌های پلاسمایی تحت آزمایش VNT

درصد فراوانی	فراوانی	عیار VNT
۱۹/۵۲	۹۸	۱/۸<
۹/۵۶	۴۸	۱/۸
۱۱/۰۰	۵۸	۱/۱۶
۲۰/۷۲	۱۰۴	۱/۳۲
۲۰/۹۲	۱۰۵	۱/۶۴
۱۳/۱۵	۶۶	۱/۱۲۸
۳/۵۸	۱۸	۱/۲۵۶
۰/۹۹	۵	۱/۵۱۲
۱۰۰ درصد	۵۰۲	مجموع

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

۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن (سوپاپنسیون ویروسی) با روش برادرفورد تعیین غلظت شده بود) به منظور انجام آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. در این روش، ابتدا آنتی‌ژن مورد نظر به فاز جامد (پلیت ۹۶ خانه‌ای NUNC) متصل شد و پس از افزودن آنتی‌بادی اولیه و انجام مراحل شستشو، آنتی‌بادی ثانویه اضافه و درنهایت با افزودن سوپرستراپ کروموزن TMB، میزان تغییر رنگ که در نتیجه فعالیت آنزیم متصل به آنتی‌بادی ثانویه است، توسط دستگاه قرائت‌گر ELISA در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد که در واقع میزان فعالیت آنزیم به طور غیرمستقیم میزان آنتی‌بادی را معین می‌کند.

سپس آزمون ELISA به ترتیب زیر انجام شد:

- به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ELISA، میکرولیتر از رقت آنتی‌ژن که حاوی ۱۰ میکروگرم از آنتی‌ژن ویروسی است، اضافه شد و در مقابل هر چاهک از آنتی‌ژن یک چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل منفی آنتی‌ژن با همان غلظت پروتئینی افزوده شد و به مدت ۱۴ ساعت در گرماخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛

۲- مرحله شستشو ۴ بار انجام گرفت؛

- ۱۵۰ میکرولیتر از محلول مسدود کننده به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و به مدت یک ساعت در گرماخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛

۴- مرحله شستشو تکرار شد؛

- رقت ۱/۵۰۰ از نمونه‌های پلاسمایی با بافر رقیق کننده آنتی‌بادی تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک‌های حاوی آنتی‌ژن و کنترل منفی آنتی‌ژن، افزوده شد. میکروپلیت به مدت یک و نیم ساعت در گرماخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛

۶- مرحله شستشو تکرار شد؛

- رقت ۱/۴۰۰۰ از آنتی‌بادی ثانویه تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به تمامی چاهک‌ها افزوده شد؛

۸- شستشو ۶ بار انجام گرفت؛

- در این مرحله به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرستراپ کروموزن (TMB) اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه

دستگاه تناسلی مبتلا هستند، انتقال می‌یابد [۲]. عفونت اولیه معمولاً به صورت تاول‌های مجتمع و دسته‌ای روی پوست یا غشاهای مخاطی ظاهر می‌شود که به شکل التهاب دهان، التهاب لثه‌ها و التهاب حلق نیز مشاهده می‌شود. این ویروس‌ها در نوزادان و افراد دارای نقص در سیستم ایمنی می‌تواند باعث آلودگی کبد، عدد آدرنال، چشم‌ها و به دنبال آن کوری شود. همچنین با هجوم به سیستم اعصاب مرکزی و مغز باعث بروز آسفالیت، منژیت و مرگ می‌شود [۹۳، ۹۴].

در کشور ما هم با توجه به اطلاعات کتابخانه‌ای و مراجعه به منابع، مطالعات مشابه کم و اغلب در جمعیت‌های محدود یا برای راهاندازی آزمون انجام گرفته است [۱۰، ۸].

در مطالعه‌ای که در سال‌های اخیر در ژاپن انجام شده است نشان داده شده که شیوع HSV-2 و HSV-1 در مراجعه‌کنندگان به کلینیک در سالین ۱۶-۱۶ سال ۶۳ درصد بوده است [۱۱]. در مطالعه دیگر با دو روش ELISA و VNT در کودکان عیار آنتی‌بادی به ترتیب ۶۲/۶ درصد و ۵۷/۳ درصد با ELISA و VNT نشان داده شده است [۱۲]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ میلادی در هند، شیوع HSV-2 و HSV-1 در مراجعه‌کنندگان به کلینیک در سالین ۱۴-۱ سال به ترتیب ۸۵/۲ و ۷۷/۳ درصد گزارش شده است [۱۱].

با توجه به اهمیت عفونت‌های 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 جواب‌های 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 نرم‌افزاری آماری Excel معیارهای نظری میزان همبستگی بین کیت مذکور و آزمایش VNT ارزیابی و این‌طور تعیین شد که لگاریتم بر مبنای ۱۰ عیار به دست آمده برای هر نمونه پلاسمای می‌تواند رابطه منطقی تری با جذب نوری قرائت شده نمونه مذکور، توسط کیت ELISA داشته باشد. به همین مظور میزان (R-Square) ضریب پیرسون بین جذب‌های نوری قرائت شده توسط کیت ELISA و نتایج حاصل

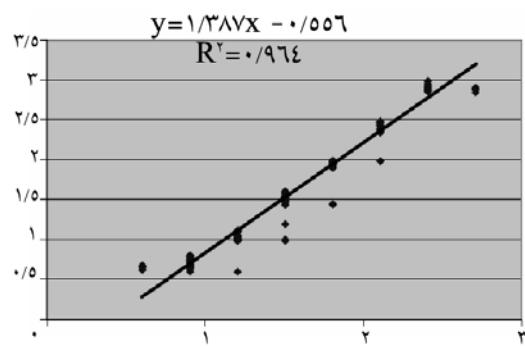
جدول ۲ اعتبار آزمون ELISA

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

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 کار گیری نرم‌افزار آماری Excel و با توجه به اطلاعات به دست آمده از نمونه‌های پلاسمای مربوط، توسط طراحی شده و آزمایش VNT معادله خط رگرسیون (Regression) (پس از رسم Scatter Plot (شکل ۱) به دست آمد که عبارت است از:

$y = ۱/۳۸۷۳X - ۰/۰۵۶$  (لگاریتم ارزش خشی‌سازی) (ELISA) جذب نوری همچنین میزان ضریب پیرسون (Pearson) برای متغیرهای فوق ۰/۹۶ تعیین شد که نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار و بسیار نزدیک بین متغیرهای مورد بررسی است.



شکل ۱ مربوط به ELISA طراحی شده و VNT

## ۴- بحث

HSV از جمله شایع‌ترین و مسری‌ترین ویروس‌های بیماری‌زا در انسان است. بسیاری از عفونت‌های 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

نیاز به تهیه سرم و مواد در شرایط استریل، روش ELISA به عنوان روش جایگزین VNT برای نشان دادن آنتی‌بادی ضد HSV در نمونه‌های سرم به‌ویژه در مطالعات اپیدمیولوژیکی و میدانی باشد و می‌تواند برای غربالگری به کار رود.

## ۵- تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان از معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی از انجام پژوهش و سازمان انتقال خون برای تأمین نمونه‌های پلاسمایی صمیمانه تشکر می‌نمایند.

از آزمایش VNT محاسبه شد. به طور کلی چنانچه میزان ضریب پیرسون محاسبه شده بین دو متغیر یک یا نزدیک به یک باشد نشان‌دهنده ارتباط کامل و معنی‌دار بین دو متغیر مورد بررسی است. چنانچه این میزان (۱) باشد نشان‌دهنده ارتباط معکوس بین دو متغیر است و چنانچه این ضریب صفر محاسبه شود نشان‌دهنده 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، معنی‌دار و نزدیک است.

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

## 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, Lippcott 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, Roostaee MH, Sadeghzadeh M, Rasaei 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, Roostaee 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<sup>۱\*</sup>، امیرحسین محبوی<sup>۲</sup>، غلامرضا مولوی<sup>۳</sup>، اسدالله حسینی چگینی<sup>۴</sup>، جعفر مسعود<sup>۵</sup>

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

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۵ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

### چکیده

هدف: لیمنه پالوستریس حلزون آب شیرین است که در گزارش‌های علمی از استان مازندران به ثبت رسیده است. این حلزون می‌تواند میزبان واسطه برخی ترماتودهای انگلی حیوانی باشد که گاه در انسان نیز دیده می‌شود. گزارش‌های در دست است که این حلزون می‌تواند میزبان واسطه فاسیولا هباتیکا نیز باشد. از آنجا که گزارشی از کم و کیف آلودگی و اکولوژی حلزون‌های فوق در استان مازندران در دست نیست، این بررسی به منظور 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 اکینوستوماسرکریا دیده شد. دمای مناسب زیست حلزون حدود ۱۵ تا ۱۹ درجه سلسیوس بوده و میزان املاح آب کلونی‌های این حلزون نیز حدود ۴۰۰ تا ۲۰۰ 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 واسطه برخی اکینوستومهای پرنده‌گان (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.

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

\* نشانی مکاتبه: هرمزانگان، دانشگاه علوم پژوهشی بندربابس، دانشکده پژوهشی، گروه انگلشناسی، صندوق پستی: ۷۹۱۴۹-۶۴۱۵۳

Email: asmoghaddam@yahoo.com

مطالعات قبلی مبنی بر وجود حلزون در منطقه و نبودن اطلاعات لازم در مورد آلدگی حلزون‌های فوق، این بررسی به منظور 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 حلزون از سیستم اطلاعات جغرافیایی بر پایه نرم‌افزار Arc View نسخه اولیه‌ای از Arc View استفاده شد. اطلاعات کامپیوتری (Digital layers) در این سیستم براساس لایه‌های رقومی (Digital layers) اطلاعات روی هم قرار می‌گیرند و به همین دلیل پردازش بصری داده‌ها واضح و پردازش کامپیوتری داده‌ها سریع و دقیق است. یکی از لایه‌های مهم مورد استفاده در مطالعات اقلیم‌شناسی ناقلين، شاخص نرمال شده تفاوت سبزینگی یا (Normalized Difference Vegetation Index) NDVI Land Sat است. این اطلاعات به صورت نقشه از ماهواره‌های به دست می‌آید. برای تهیه این نقشه‌ها فرکانس رنگ ساطع شده از زمین طی محاسباتی به عددی بین ۱-۱+ برای مناطق کویری تا ۱+ برای جنگل تبدیل می‌شود. هر عدد بیانگر سبزینگی 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

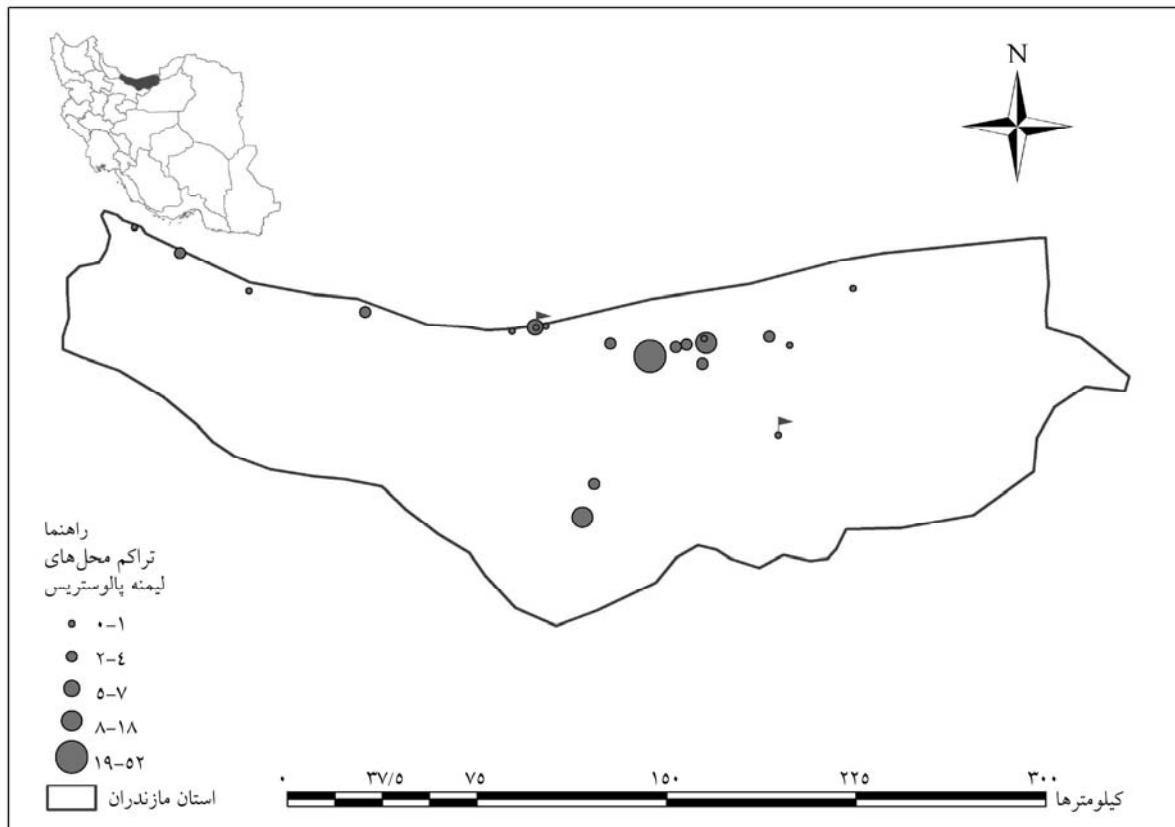
در یک مطالعه توصیفی روی جمعیت حلزون‌های لیمنه پالوستریس استان مازندران، بیش از ۱۸۱ نقطه در سطح استان بررسی شد.

مواد و وسایل مورد استفاده عبارت بودند از پارویی صید حلزون به ابعاد  $20 \times 20$  سانتی‌متر، دست‌کش، پنس، آب معدنی و آب دکله، دبه، پتری‌دیش، لام، میکروسکوپ تشریح (لوب) و میکروسکوپ نوری معمولی و کولیس، GPS، دستگاه pH متر صحرایی، دستگاه کدروت‌سنچ (TDScan) صحرایی برای اندازه‌گیری TDS (Total Dissolved Solids) (میزان املاح آب)

## 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 استنشاهی از گروه Trematoda (Trematoda) هستند. در این میان، انواع شیستوزوما (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 شیستوزومیازیس (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 شیستوزومیازیس هماتویوم (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 ترونکاتولو (*Galba truncatula*) است و گذشته از ابعاد بزرگ آن که ممکن است تا ۳-۲ سانتی‌متر برسد، فاقد پیچش‌های برجسته یا سوچرهای (Sutures) عمیق 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



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

مطالعه و تراکم حلزون ارتباط داشت. حاشیه رودخانه ها و آبگیرهای در استان مازندران بررسی شد که فاصله هیچ یک از نقاط کمتر از ۱۰۰ متر نبود. شکل ۱ پراکندگی نقاط مورد مطالعه در استان مازندران را نشان می دهد.

### ۱-۳-۲- زمان

عملیات میدانی این مطالعه از سال ۱۳۸۱ تا سال ۱۳۸۳ ادامه داشته است. در هر دوره از مأموریت که بین ساعت ۸ تا ۱۲ صورت گرفت، حلزون ها پس از جمع آوری در دبه های حاوی آب دکله و یا آب معدنی قرار داده شد. سپس آشغال ها و زوائدی که همراه حلزون جمع آوری می شد از آن جدا و دبه ها به آزمایشگاه حلزون شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال یافت و در صورتی که بلا فاصله امکان شروع عملیات آزمایشگاهی وجود نداشت، در ایستگاه تحقیقاتی بابل با اضافه کردن آب دکله و کاهو به عنوان غذا،

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

### ۱-۲- عملیات صحرا ای

#### ۱-۱-۲- نوع جمع آوری حلزون

با توجه به شرایط اقلیمی و ساختار محیط آبگیرهای منطقه، روش «برحسب نفر» برای جمع آوری حلزون استفاده شد [۱۱]. برای این منظور تعداد حلزون جمع آوری شده توسط پارویی حلزون شناسی تقسیم بر تعداد پارو زدن ها شده و متوسط آن بدست آمد.

#### ۱-۲-۲- حجم نمونه و مکان

همچون سایر مطالعات حلزون شناسی، 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](http://www.NOAA.gov) به دست آمد.

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 پاره 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  $= \frac{(N1V1)+(N2V2)+\dots}{n}$ .

### 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 بر حسب شکل ظاهري در گروه اکینوستوما سرکریا (*Echinostoma cercaria*) قرار داشتند. در اکینوستوماسرکریا، حلقه‌ای از خار اطراف سرکر را می‌پوشاند. هیچ مورد مشکوک به سرکر فاسیولا مشاهده نشد. برای یافتن میزان واسطه دوم 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 میزان واسطه دوم دیده نشد. از آنجا که ممکن بود خود لیمنه پالوستریس به عنوان میزان واسطه 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 موقوفیت‌آمیز 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 پاره 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 اوخر زمستان در نواحی پست و آب‌گرفته شمالی استان بیشتر می‌شود و در فصل تابستان در نواحی خنک‌تر کوهستانی بیشتر دیده می‌شود. در کلونی‌های

### 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 پتری دیش 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 میزان واسطه دوم مهم باشد، بسته به نوع احتمالی آلودگی، نمونه‌هایی پس از یک شب برای تشکیل احتمالی متاسرک (*Metacercaria*) بازیین 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 روشن‌های آماری توصیفی و ANOVA استفاده شد.

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

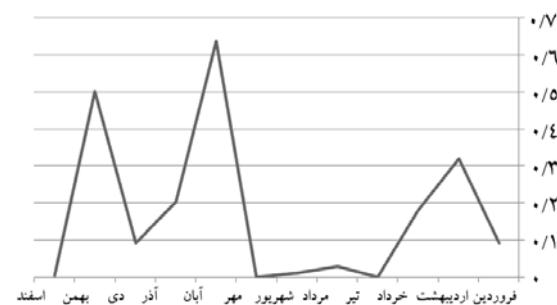
ماه	۱۲ تا ۱۴	۱۱ تا ۱۳	۸ تا ۱۰	۵ تا ۷	جمع
میلی متر					
فروردين	۰	۰/۰۶۷	۰/۱	۰/۰۴۳	۰/۶
اردبیهشت	۰/۱۳۳	۱	۰/۲	۰/۰۳۳	۱/۱۳۷
خرداد	۰	۰/۱۳۳	۰/۶	۰/۱۳۳	۰/۸۶۷
تیر	۰	۰	۰	۰	۰
مرداد	۰	۰/۱	۰/۱	۰	۱/۲
شهریور	۰	۰/۰۵	۰	۰	۰/۰۵
مهر	۰	۰	۰	۰	۰
آبان	۰	۰/۷۲۵	۰	۰/۶۲۵	۳/۳۵
آذر	۰	۰/۷۶۹	۰	۰/۳۸۵	۱/۱۵۴
دی	۰	۰/۱	۰/۱	۰/۰۳	۰/۴
بهمن	۱	۰	۰	۰/۰۳۳	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 ۴۰۰ تا ۲۰۰ 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 سبزینگی مناطقی که لیمنه پالوستریس دیده شده است، در نیمه اول سال  $141 \pm 141$  و در نیمه دوم سال  $136/18 \pm 7/33$  بوده است.

جدول ۱ وفور کلونی های یافته شده لیمنه پالوستریس در دمای های مختلف آب

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

پایش جمعیت حلزون نشان داد کلونی های لیمنه پالوستریس در فصل پاییز و زمستان افزایش می یابد، اما سرمازی زمستان از تعداد حلزون های بهاره می کاهد. جدول ۲ 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 به طور 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 پروفسور ماریو فوئنتس (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 زومگار (Goumghar) هاپلومترا سیلیندریکا (Haplometra cylindrica) را در لیمنه پالوستریس گزارش کرده است [۱۶]. لیمنه پالوستریس به‌طور کلاسیک میزبان واسط انواع اکینوستوما روولوتوم (Echinostoma revolutum) و اکینوپاریفیوم رکوروواتوم (Echinoparyphium recurvatum) معرفی شده است. هر چند شیوع اکینوستوما روولوتوم 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. عمدۀ محدودیت و مانع بر سر راه این تحقیق، شرایط آب و هوایی سخت برای عملیات صحراوی و عدم رشد سرکرهای به‌دست آمده در حیوانات آزمایشگاهی برای تعیین دقیق نوع انگل بود و این مطالعه می‌تواند به روش شدن چرخه زندگی این انگل‌ها در استان مازندران کمک کند. از آنجا که دیپلóstوموم 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 fauna of fresh 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, Ferdinand 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 توالی یابی ژن GRA7 (Granular Antigen7) توکسoplasmagondiae

فاطمه غفاری فر<sup>۱\*</sup>، رحمه نوردین<sup>۲</sup>، زهره شریفی<sup>۳</sup>، عبدالحسین دلیمی<sup>۴</sup>، شهلا رودبار محمدی<sup>۵</sup>، سکینه قاسمی نیکو<sup>۶</sup>

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

پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۱۱ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

### چکیده

هدف: توکسoplasmagondiae تک یاخته‌ای داخل سلولی و عامل ایجاد توکسoplasmozis بوده و دارای انتشار جهانی است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه تهیه واکسن صورت گرفته که منجر به ایجاد پاسخ‌های محافظت‌کننده شده است. آنتی ژن GRA7 با وزن مولکولی ۲۹ کیلو Dalton یک آنتی ژن ترشحی گرانولی فشرده است که به وسیله سلول‌های آبوده می‌باشد. در سلول‌های آبوده به تاکی‌زوئیت، پروتئین ۲۹ کیلو Dalton پارازیتوفروز تجمع پیدا می‌کند. علاوه بر ایمونوژن بودن و کاندیدای تهیه واکسن در تشخیص نیز به کار می‌رود.

مواد و روش‌ها: برای این کار ابتدا DNA توکسoplasmagondiae را با روش فنل کلروفرم استخراج شده سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن GRA7 این قطعه با استفاده PCR تکثیر و در ناقل TOPO کلون شد. پلاسمید کلون شده در باکتری TOP10 ترانسفورم شد. با استفاده از PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی 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 نوکلوتیدی فقط در یک باز تفاوت داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که کلون به دست آمده برای ساخت کلون در پلاسمیدهای بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی مناسب است.

کلیدواژگان: توکسoplasmagondiae، ژن GRA7، کلونینگ، توالی یابی

### ۱- مقدمه

مادرزادی و سقط جنین در انسان و حیوانات اهلی دارای اهمیت پزشکی و دامپزشکی است [۱، ۲]. توکسoplasmozis می‌شود و گسترش جهانی دارد. این بیماری به علت عفونت

توکسoplasmosis (Toxoplasmosis) توسط تک یاخته‌ای انگلی به نام توکسoplasmagondiae (Toxoplasma gondii) ایجاد می‌شود و گسترش جهانی دارد. این بیماری به علت عفونت

\* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱  
Email: ghafarif@modares.ac.ir

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

آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلاسمای گوندهای از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های به‌کار رفته هم در زمینهٔ واکسن و هم در زمینهٔ 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 زمینهٔ تشخیص و هم اینمی‌زایی به‌کار برد هم شوند.

ژن GRA7 پروتئین ۲۹ کیلودالتونی را کد می‌کند که این پروتئین توسط سلول‌های میزبان این انگل ترشح می‌شود. در سلول‌های آلوه به تاکی‌زوئیت‌ها تجمع این پروتئین در واکوئل پارازیتوفروز (Parasitophorous vacuole) صورت می‌گیرد. در سلول‌های آلوه به‌برادی‌زوئیت‌ها در سیتوپلاسم سلولی حضور دارد و به‌وسیلهٔ 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 الیزا (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 ساب‌کلوبینگ در پلاسمیدهای یوکاریوت و پروکاریوت است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۱-۱- تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلاسمای گوندهای

تاکی‌زوئیت‌های این انگل با پاساز (Passage) متوالی داخل صفاتی در موش‌های سوری نگهداری و تکثیر

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

تاکنون در ایران در مورد تهیه واکسن بر اعلیه توکسوپلاسموزیس تحقیقاتی انجام شده است، در سال ۱۹۸۰ محمودی (Mahmoudi) و قربانی (Ghorbani) در دانشکده بهداشت دانشگاه تهران اثر محافظت کنندگی توکسوپلاسمای 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) توکسوپلاسمای گوندهای 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 برخنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کد شده را بیان می‌کند [۳]. در سال ۲۰۰۷ صلح‌جو (Soljoo) و همکاران واکسن DNA را با استفاده از ژن SAG1 برای ایمن‌سازی در موش علیه توکسوپلاسمای گوندهای 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 مترشحه توصیف شدند زیرا وقتی انگل با سرم انکوبه می‌شود این مواد ترشح می‌شوند [۸]. آنتی‌ژن‌های گرانولی یا GRA از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی هستند که

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 dNTP، ۲ میکرولیتر بافر  $10 \times$ ، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیوم، ۱ میکرولیتر DNA پلیمراز (Taq DNA polymerase)  $0/5 \times$  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: واسرتستگی اولیه (Initial Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی گراد، واسرتستگی ۱ دقیقه در ۹۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال (Annealing) ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال (Extension) ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، بسط (Expansion) ۵ چرخه تکرار دمای ۷۲ درجه سانتی گراد؛ سه مرحله اخیر ۵ چرخه تکرار شد، سپس واسرتستگی 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)، مخلوطی بریده شده درون کیت موجود است (Invitrogen)، محلول نمک 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 صفاقتی حاوی  $2 \times 10^5$  تاکیزوئیت زنده به طور داخل صفاتی تلقیح شد و پس از گذشت ۴ الی ۵ روز، مایع صفاقتی موش های آلووده به وسیله سرنگ های ۵ سی سی یا ۱۰ سی سی جمع آوری شد [۱۰].

## ۲-۲- استخراج (DNA Extraction) DNA

۱۰۰ میکرولیتر (در حدود  $5 \times 10^7$ ) از تاکیزوئیت های تغییض شده و شستشو شده با بافر (Phosphate Buffered Saline) PBS درون یک ویال ۱/۵ سی سی ریخته شد و با روش فنل کلروفرم 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 اسپکترو فوتومتری 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> با شماره ‘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) ۲۶

R: 5'-ctt-gtt-acc-gcc-ccc-ata-tcc-tac-tgg-c-3'  
Kpn (جفت باز) ۲۸

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 کلونی‌های 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 (به علت وجود قطعه کلون شده در آن) سنتگین‌تر از پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های آبی هستند؛ برای این منظور پلاسمیدهای استخراج شده از پلاسمیدهای کلونی‌های آبی و سفید روی ژل آگاراز 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 به عنوان 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)

به منظور تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید TOPO، ابتدا پلاسمیدهای موجود در باکتری‌های کلونی سفید به منظور 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 (Transformation) TOP10

باکتری مستعد را از فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد خارج کرده و به مدت 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 ورتكس (Vortex) و به آرامی با هم مخلوط می‌کنیم و ۲۰ دقیقه در یخ انکوبه می‌کنیم. سپس به مدت 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 به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور شیکردار (Shaker incubator) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

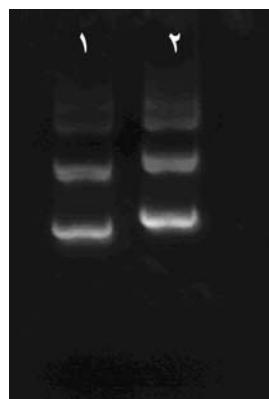
#### ۲-۷- غربال کردن (Screening) کلون‌های

##### باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

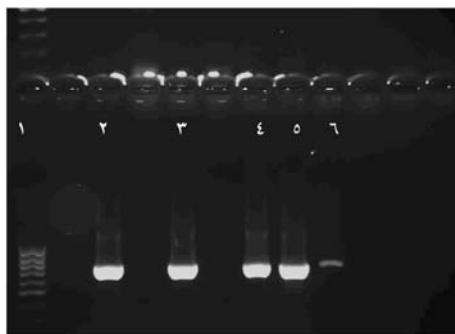
پس از انتقال DNA نوترکیب به درون سلول میزبان لازم است که کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب مناسب، غربال و انتخاب شوند.

اگر X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) همراه با یک القاء کننده آنزیم یعنی ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوید (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) آمپیسیلین به آگار اضافه شود، کلونی‌های فاقد پلاسمید نوترکیب 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 حالی که کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب چون قادر به ساخت بتاگالاکتوزیداز نیستند نمی‌توانند X-gal را تجزیه کنند، بنابراین کلونی آن‌ها به رنگ سفید خواهد 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 به صورت وارونه به مدت یک شب (۱۶-۱۸ ساعت) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به مدت چند ساعت

کرده‌اند و پلاسمیدهای نوترکیب 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 سوپرکوبل (Super coil) به‌طوری‌که 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 سنتگین‌تر هستند (شکل ۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که قطعه GRA7 در پلاسمید TOPO کلون شده است. پس از تأیید کلون نوترکیب، از کلونی مربوط کشته 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 روی ژل آگارز؛ ستون ۱: نیشانگر جفت‌بازی؛ ستون‌های ۲-۶: محصول PCR به دست آمده از ژن SAG1 (به عنوان کنترل مثبت)؛ ستون‌های ۳ و ۴: محصول PCR ژن TOPO پلاسمیدهای قطعه ژنی حاصل از PCR را دریافت

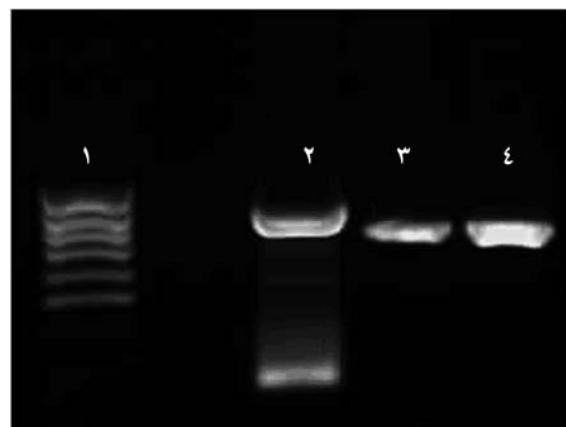
توالی ژن کلون شده به کمک سایت ایترنتسی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تشابهات و اختلافات با ژن GRA7 توکسوپلاسمما گوندهای مقایسه شد.

### 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 توکسوپلاسمما گوندهای 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: نیشانگر ۱۰۰ (Marker) جفت‌بازی؛ ستون ۲: محصول PCR به دست آمده از ژن GRA7 PCR ژن SAG1 (به عنوان کنترل مثبت)؛ ستون‌های ۳ و ۴: محصول PCR ژن TOPO

#### ۳-۲- نتایج ترانسفورماسیون باکتری‌ها با محصول واکنش اتصال

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

Tgtatgtgaagtaccctataattggggcttgcatacgtttgtattaaaaggga ttactgcggcgcttcattccaaatggcccaca(g)cgcattttccgcg ctttgttttaggcctggcgccggcttgcgcggccagtcgcacccggc caccgcgtcagatcagaactgtatgcataatccgaaatctgcactttcg atggtaagcaccgtgacagtcgcacccgacgaacgcgggtgcgact cgaaggaggaccgacatcacccaccacccagcatggataaggcatgtgta gagagtcagcgtccgagaagagagccattggagacggacggccagatgaac aagaagaaggatcatttcaggaaaggcgaggcgtccgcacgtaaaggta ctgacgacaacatcacgaggcggcactgtatgcataagggttccgagga agtgcggaggcgaagctcaaaagacttgcgtaagaagactgcgcgtc cccgcgtttgttatgggtgcacgtatggccgtatagacttgtccgga actaacagaggagaacacagagaggcagcaacccctaaccacccgcca gaatgtgggcactgtttaggcctgcagcgttgcgtgcgcgcagcgtc ctggcattgggtcactcaggacgtaccgacattttcccaacgaaaaaca gatcacccgcagcgtcgcacccgacaaagggtgcataatcggcgaagat gggaggatgcggcccgataggatatggggcataaaaagtgcgttgg acgtcgagacatgtcccgaa

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 تابی cgg تبدیل به cga شده که هر دو توالی اسید آمینه آرژینین را کد می‌کنند. جایگاه آغازگرها روی ژن مشخص شده است.

### ۳-۳- نتایج PCR قطعه GRA7 با استفاده از

#### پلاسمید نوترکیب TOPO-GRA7 به عنوان الگو

نتایج حاصل از الکتروفوروز محصول PCR با پلاسمید نوترکیب TOPO-GRA7 با استفاده از آغازگرهای یونیورسال در شکل ۶ نشان داده شده است و گویای این است که ژن GRA7 در پلاسمید TOPO کلون شده است.



شکل ۶ نتایج به دست آمده از PCR پلاسمید حاوی ژن GRA7: از طرف چه ستون: ۱: نشانگر ۱۰۰ جفت باز؛ ستون‌های ۲ و ۳: محصول ژن PCR GRA7 به دست آمده از محصول PCR با استفاده از آغازگرهای یونیورسال است که با استفاده از این آغازگر قطعه تکثیر شده ۹۵۰ جفت باز است.

### ۴- بحث

توكسوپلاسموزیس از عفونت‌های شایع انسان است. عفونت طی دوره بارداری می‌تواند منجر به توكسوپلاسموزیس 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 توكسوپلاسموزیس در افرادی AIDS که دارای نقص سیستم ایمنی هستند مثل افراد مبتلا به 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 [۸، ۵]. این آنتی‌ژن‌ها به وسیله تاکیزوئیت‌ها و برادیزوئیت‌ها بیان می‌شوند [۶]. از اعضای آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی مولکول‌های GRA4 هستند. GRA4 (۴۰ کیلو Dalton) GRA1 (۲۳ کیلو Dalton) و GRA7 (۲۹ کیلو Dalton) به عنوان

گزینه‌های واکسن شناخته شده‌اند [۶، ۱۳، ۱۴]. آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توكسوپلاسمما گوندهای از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های به کار رفته هم در زمینه واکسن و هم در زمینه تشخیص

### ۴-۴- نتایج تعیین توالی

پس از بررسی و مقایسه نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده در پلاسمید TOPO با ژن GRA7 توكسوپلاسمما گوندهای به کمک سایت ایترنتسی [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) مشخص شد که قطعه‌ای ۷۴۹ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن GRA7 توکسوپلاسمما گوندهای 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 <sup>a</sup> تبدیل به باز <sup>b</sup> شده است. در توالی سه تایی CGA تبدیل به CGG شده که این تفاوت باز روی نوع اسیدآمینه کد شونده تأثیر ندارد و هر دو توالی اسیدآمینه 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 نوترکب 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 سابکلون کردن آن در این پلاسمید برای تهیه واکسن DNA مناسب می‌شود و همچنین با توجه به موقعیت کدون شروع کننده ATG در پلاسمید نوترکیب TOPO-GRA7 مناسب برای سابکلون کردن این ژن در پلاسمید پروکاریوتی pROXT(b) برای تولید آنتی‌ژن نوترکیب در باکتری است و آنتی‌ژن 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 تقدير را به عمل آورم، به خصوص از آقای دکتر فتح اللهی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که زمینه را برای مأموریت تحقیقاتی اینجانب فراهم نمودند و همچنین آقای دکتر صدرالایی مدیر محترم گروه انگل‌شناسی، خانم دکتر اسماء اسماعیل ریاست محترم انسستیتو تحقیقاتی پزشکی مولکولی مالزی و خانم گیتا سعادت‌نیا دانشجوی دکتری انسستیتو تحقیقاتی پزشکی مولکولی مالزی.

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 مخصوصاً در زمینه تشخیص به کار برده می‌شوند. ژن GRA7 پروتئین ۲۹ کیلو Daltonی را کد می‌کند که این پروتئین توسط سلول‌های میزبان این انگل ترشح می‌شود [۱۴].

پروتئین ۲۹ کیلو Daltonی (GRA7) وقتی همراه با پروتئین‌های ۳۰ و ۳۵ کیلو Daltonی 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 آنتی‌ژن نوترکیب برای تشخیص از کاندیداهای اصلی در تشخیص توکسوپلاسموزیس به کار می‌رود. استفاده از این آنتی‌ژن برای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس به خصوص در موارد خطرناک کشته 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.* 1<sup>st</sup> 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 Infec 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.* 1<sup>st</sup> 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. *Infec 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.* 1<sup>st</sup> 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 Seras 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.

