

بررسی پلی مورفیسم‌های ژن NOS2A در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و

مقایسه آن با افراد نرمال

چکیده

زمینه و هدف: شواهد متعددی در خصوص حضور و نقش نیتریک اکساید (NO=Nitric oxide) در پاتوژنز آرتریت روماتوئید وجود دارد. NO، توسط آنزیمی بنام نیتریک اکساید سنتتاز القائی (iNOS=Induced Nitric oxide syntetase) تولید می‌شود. NO در سینوویوم، غضروف و سلول‌های تک هسته‌ای لنفوسیتی موجود در مایع سینوویال و لنفوسیت‌ها و منوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید نیز دیده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که پلی مورفیسم‌های موجود در ژن کدکننده آنزیم iNOS (NOS2A) با استعداد ابتلا به بیماری‌های التهابی و خود ایمنی مختلف در ارتباط هستند. هدف از انجام این مطالعه، تعیین پلی مورفیسم‌های موجود در موقعیت 1659C/T- و 150C/T+ ژن در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و مقایسه آن با افراد نرمال بود.

روش بررسی: در این مطالعه موردی-شاهدی، پلی مورفیسم‌های موجود در موقعیت 1659C/T- و 150C/T+ ژن NOS2A در ۱۷۶ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید و ۲۳۲ فرد نرمال، به ترتیب به روش‌های PCR- Allele Specific و PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction fragment length polymorphism) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نرم‌افزار SPSS 10 و آزمون‌های آماری مجذور کای (χ^2) و Fisher's Exact جهت مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین بیماران و افراد نرمال مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: پس از تجزیه و تحلیل آماری ارتباط معنی‌داری در مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های 1659C/T- بین گروه بیمار و کنترل مشاهده گردید ($P=0/03$). در واقع ژنوتیپ هموزیگوت CC در افراد نرمال (۷۵٪) به‌طور معنی‌داری بیش از بیماران (۶۴/۲٪) می‌باشد. در مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های 150C/T+، بین گروه بیمار و کنترل ارتباط معنی‌داری مشاهده نگردید ($P=0/33$). همچنین پرونده بالینی بیماران مورد مطالعه قرار گرفت و اطلاعاتی از قبیل CRP (CRP), RF (Rheumatoid factor), خوردگی مفاصل، علائم خارج مفصلی، تغییر شکل مفاصل، ندول روماتوئید و سن شروع بیماری جمع‌آوری و ثبت گردید. ارتباط بین ژنوتیپ‌های 1659C/T- و 150C/T+ و علائم بالینی و یافته‌های پاراکلینیکی مورد آنالیز آماری قرار گرفت و تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که در این تحقیق که اولین مطالعه در زمینه ارتباط بین پلی مورفیسم‌های 1659C/T- و 150C/T+ ژن NOS2A و بیماری آرتریت روماتوئید می‌باشد، رابطه معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های 1659C/T- در بین گروه بیمار و کنترل یافت گردید؛ لذا به نظر می‌رسد انجام مطالعات مشابه در جمعیت‌های دیگر در شناخت نقش آنزیم iNOS و NO در بیماری آرتریت روماتوئید دارای اهمیت باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱- آرتریت روماتوئید ۲- نیتریک اکساید سنتتاز القائی ۳- پلی مورفیسم ژن نیتریک اکساید سنتتاز 2A

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۱۶، تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۲

مقدمه

واسطه‌های التهابی نظیر نیتریک اکساید (NO=Nitric oxide) در ایجاد این تظاهرات نقش دارند^(۱). تولید NO در پاتوژنز بیماری از راه‌های گوناگونی تأثیر دارد. در پاسخ به تحریک سایتوکاین‌ها، NO درون مفاصل تولید می‌شود و تأثیراتی روی سلول‌های سینوویال و اعمال

آرتریت روماتوئید شایع‌ترین فرم پلی آرتریت مزمن التهابی می‌باشد و از برهمکنش عوامل محیطی، ژنتیکی و ایمنولوژیک ایجاد می‌گردد. تظاهرات مفصلی و خارج مفصلی این بیماری ناشی از التهاب مزمن مفصلی و سیستمیک می‌باشد و از سوی دیگر سایتوکاین‌ها و دیگر

این مقاله خلاصه‌ای از پایان‌نامه خانم بهاره عبد نیک‌فرجام در مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر اسکندر کمالی و دکتر زهرا امیرغفران و مشاوره دکتر الهام افلاکی می‌باشد.

(I) مربی و کارشناس ارشد ایمنولوژی، گروه ایمنی‌شناسی و میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین، قزوین، ایران (* مؤلف مسؤول).

(II) استاد و دکترای ایمنولوژی، گروه ایمنی‌شناسی و مرکز تحقیقات بیماری‌های خودایمن، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شیراز، شیراز، ایران.

(III) استادیار و فوق تخصص روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شیراز، شیراز، ایران.

کندروسیت‌ها می‌گذارد که سبب آغاز تخریب غضروف مفصلی می‌گردد. این تأثیرات روی سلول‌های سینیویال و کندروسیت‌ها شامل مهار سنتز کلاژن و پروتئوگلیکان،^(۳۲) فعال شدن متالوپروتئینازها^(۴) افزایش حساسیت به آسیب توسط دیگر اکسیدان‌ها (H₂O₂) و آپوپتوز^(۶۵) می‌باشد. شواهد متعددی در خصوص حضور و نقش NO و آنزیم تولید کننده آن (iNOS) در پاتوژنز آرتریت روماتوئید وجود دارد؛^(۷-۹) از آن جمله افزایش غلظت نیتريت‌ها درون مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید، ۳۵ تا ۶۶ بار بیشتر از بیماران مبتلا به استئوآرتریت می‌باشد.^(۱۰) بعلاوه در مایع سینیویال این بیماران، نیتروزوپروتئین‌ها بیشتر از سرم وجود دارند که نشان‌دهنده تولید مقادیر زیادتر NO درون مفاصل می‌باشد. با استفاده از روش‌های ایمونو-هیستوشیمی، هیبریدیزاسیون درجا و RT-PCR، بروز iNOS در بیماری‌های آرتریت روماتوئید، مالتیپل اسکروزیس و سندرم شوگرن مشخص شده است. در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید، لایه پوشاننده سینیویال، زیرسینیویوم، عضله صاف عروقی، کندروسیت‌ها و سینیویوسیت‌ها، iNOS را به مقدار بسیار زیاد بروز می‌دهند؛^(۱۲،۱۱) لذا در آرتریت روماتوئید، سینیویوم و غضروف منابع اصلی تولید مقادیر بالای NO می‌باشند. افزایش بروز iNOS و افزایش تولید NO در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید، با فعالیت بیماری مرتبط می‌باشد.^(۱۴،۱۳) iNOS در یک نقطه کنترلی مهم بیولوژیکی قرار دارد و در حساسیت به بیماری‌های مختلف شرکت می‌کند. یک موتاسیون در موقعیت +150 اگزون ۱۶ ژن iNOS باعث تبدیل نوکلئوتید C به نوکلئوتید T می‌شود که اسید آمینه Ser (سرین) در موقعیت 608 این آنزیم را تبدیل به اسید آمینه Leu (لوسین) می‌نماید که ممکن است در عملکرد آنزیم نقش داشته باشد. تست‌های عملکردی ویژه تغییر C/T برای اثبات اهمیت این پلی مورفیسم

(Ser⁶⁰⁸Leu) باید انجام گیرد.^(۱۷-۱۵) پلی مورفیسم موجود در موقعیت 1659- پروموتور ژن آنزیم iNOS باعث تبدیل نوکلئوتید C به نوکلئوتید T می‌شود و اتصال پروتئین‌های هسته‌ای را تغییر می‌دهد با توجه به حرکت ترجیحی (Linkage Disequilibrium) بین سایت‌های پلی مورفیک مختلف در ژن این آنزیم، در مطالعات آینده آزمایش اینکه آیا یک پلی مورفیسم نقطه‌ای واحد خاص یا هاپلوتایپ در تأثیرات عملکردی اهمیت دارند، ضروری به نظر می‌رسد.^(۱۸،۱۹) جهت آزمایش امکان تأثیر پلی مورفیسم 1659- بر روی برهمکنش‌های پروتئین-DNA از رده سلولی شبه ماکروفاژی انسانی به نام HL-60^{hea} (یک فنوتیپ چسبنده مشتق از HL-60) استفاده شده است. این رده سلولی توسط Lipopolysaccharide (LPS) جهت تولید NO توسط iNOS القا می‌شود. عصاره هسته‌ای سلول‌های تحریک نشده و تحریک شده با LPS، با یک پروب Oligoduplex شامل سایت NOS2A-1659 انکوبه می‌شوند. برای هر دو فرم الی، یک کمپلکس پروتئین-DNA مشاهده می‌شود که به‌طور معنی‌داری بدنبال تحریک با LPS به مدت ۳۰ دقیقه فرا تنظیم می‌شود. شدت کمپلکس‌های ساختاری و القایی برای ال NOS2A-1659C به‌طور قابل توجهی از ال NOS2A-1659T بالاتر می‌باشد.^(۲۰) هدف از انجام این مطالعه، تعیین پلی مورفیسم‌های ذکر شده در فوق در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و مقایسه آن با افراد نرمال بود. این پلی مورفیسم‌ها تا کنون در این بیماری مطالعه نشده‌اند.

روش بررسی

در این مطالعه موردی-شاهدی، ۱۷۶ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید با میانگین سنی ۴۵±۱۲/۷ سال و محدوده سنی ۷۲-۱۹ سال مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران با توجه به علائم کلینیکی، اطلاعات حاصل از پرونده پزشکی و تأیید وجود بیماری توسط فوق

اتانول ۷۰٪ انتقال داده شد و در ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس اتانول ۷۰٪ کاملاً دور ریخته شد.

۶- پس از خشک شدن DNA در دستگاه Dri-block با درجه حرارت ۶۰ سانتی‌گراد، ۳۰۰-۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به آن اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا DNA کاملاً حل شود.

برای تعیین غلظت DNA استخراج شده، ۱۰ میکرولیتر محلول DNA با ۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر رقیق شد. جذب نوری در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (به ترتیب طول موج‌های ماگزیم جذب نور برای DNA و پروتئین) به کمک دستگاه UV اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر آن‌ها مساوی یا بالاتر از ۱/۵ بود، جهت انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

فاکتور رقت $\times OD_{260} \times 50 = \mu\text{g/ml}$ غلظت DNA
غلظت نهایی DNA مورد استفاده برای PCR روی ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) تنظیم شد و جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

در روش PCR- Allele -Specific، برای هر نمونه DNA، دو لوله انتخاب شد. لوله شماره ۱، برای تکثیر آلل نوع اول و لوله شماره ۲، جهت تکثیر آلل نوع دوم در نظر گرفته شد. به هر دو لوله مواد به ترتیب براساس مقادیر درج شده در زیر اضافه شد (تنها تفاوت لوله شماره ۱ و ۲ در پرایمر Forward بود). جهت اطمینان از نتایج PCR، از کنترل داخلی استفاده شد. کنترل داخلی در این بررسی، ژن بتاگلوبین بود. محتویات لوله‌ها توسط چرخش سریع و کوتاه مدت با میکروسانتریفوژ کاملاً مخلوط شدند و جهت انجام مراحل PCR، در دستگاه

تخصص روماتولوژی انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به تاریخچه بیماری و وضعیت بالینی از قبیل تعداد و نوع مفاصل درگیر، وجود دفرمیتی، خوردگی، RF، ESR و... با استفاده از پرونده بیماران جمع‌آوری شد.

در این مطالعه ۲۳۲ فرد نرمال با میانگین سنی ۴۰±۹/۵۲ سال و محدوده سنی ۷۴-۱۹ سال که فاقد هر گونه علامت یا نشانه‌ای از بیماری‌های خودایمنی در خود یا بستگان درجه اول خود بوده و سابقه بیماری خاصی نداشتند، به عنوان گروه کنترل بررسی شدند. از افراد مورد مطالعه، حدود ۵cc خون محیطی گرفته و به لوله‌های حاوی ۷۵ میکرولیتر EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۱۰٪ (PH=۸) انتقال داده شد.

بررسی پلی مورفیسم ژن NOS2A (Nitric oxide Synthase-2A) با استخراج DNA به روش Salting out به شرح زیر بود:

۱- به ۳-۵ سی سی خون حاوی EDTA، جهت حذف گلبول‌های قرمز، ۱۰-۷ سی سی از تریس بافر ۱ (PH=۸) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و عمل فوق بر روی رسوب باقی مانده، ۲-۳ بار تکرار گردید تا مایع رویی کاملاً بی‌رنگ و شفاف شد.

۲- رسوب حاصل با استفاده از ۱ سی سی محلول تریس بافر ۲ (PH=۸) در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه لیز شد تا مایع شفاف بدست آمد.

۳- به منظور جداسازی پروتئین‌ها از DNA، به نمونه‌ها ۰/۵ سی سی محلول اشباع کلرید سدیم (NaCl) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور سانتریفوژ شد.

۴- مایع رویی به آرامی به لوله فالكون دیگری منتقل و ۱-۱/۵ سی سی اتانول خالص به آرامی به آن اضافه شد و پس از چند مرتبه سر و ته نمودن لوله جهت مخلوط شدن، رشته‌های DNA، تجمع یافته و بصورت کلاف قابل رویت درآمد.

۵- کلاف DNA به لوله اپندورف حاوی ۱ سی سی

ترموسایکلر قرار گرفتند.

در روش PCR-RFLP، برای هر نمونه DNA، به هر لوله، مواد به ترتیب براساس مقادیر درج شده در زیر اضافه شد و محتویات لوله‌ها توسط چرخش سریع و کوتاه مدت با میکروسانتریفوژ کاملاً مخلوط شدند و روغن معدنی جهت جلوگیری از تبخیر مواد در هنگام انجام PCR، اضافه شد و جهت انجام مراحل PCR، در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. سپس ۳ میکرولیتر از محصول PCR جهت اطمینان از انجام واکنش الکتروفورز گردید. پس از اطمینان از انجام واکنش PCR به ۷ میکرولیتر محصول باقیمانده طبق فرمول ذیل آنزیم اضافه شد:

Restriction Enzyme (10units/μl): 0. 2 μl
Buffer B (10 X): 1. 4 μl
Deionized water: 5. 4 μl

جدول شماره ۱- حجم و غلظت مواد مورد استفاده در تست‌های PCR

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

در موقعیت 1659-، آنزیم FspBI (MaeI) توالی 5'...C↓ T A G...3' را در صورت وجود شناسایی و هضم می‌نمود. برای انجام واکنش، نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند. جهت تعیین ال‌ها در موقعیت +150، آنزیم

TasI (TspEI) مورد استفاده قرار گرفت. این آنزیم توالی 5'...A A T T...3' را در صورت وجود شناسایی و هضم می‌نمود. برای انجام واکنش نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند.

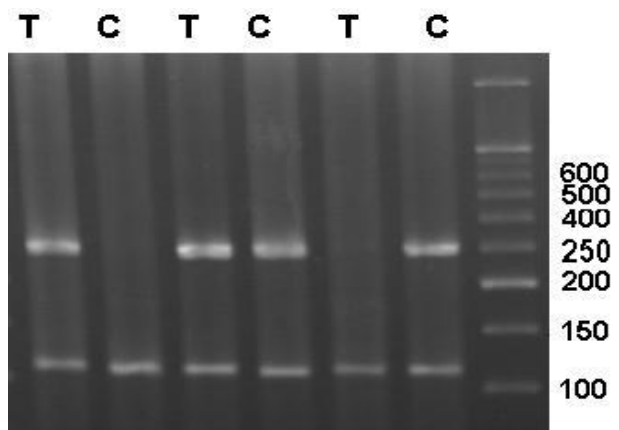
حجم و غلظت مواد، توالی پرایمرها و برنامه‌های PCR مورد استفاده جهت تکثیر ژن iNOS در جدول‌های شماره ۱، ۲ و ۳ به نمایش در آمده است.

جدول شماره ۲- پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن NOS2A

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

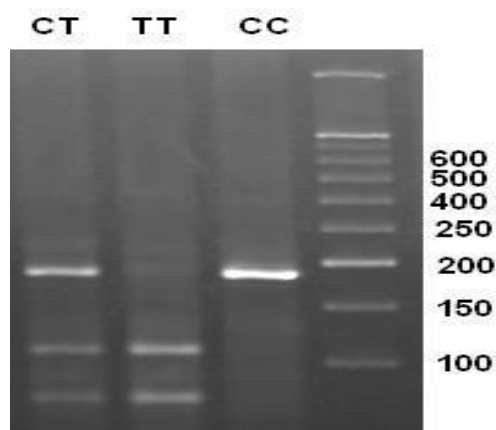
جدول شماره ۳- برنامه‌های PCR جهت تکثیر ژن NOS2A:

روش PCR	برنامه‌های PCR
-1659 C/T (Allele Specific)	Long denaturation 95°C 5min
	1. Denaturation 95°C 30Sec
	2. Annealing 65°C 30Sec
	3. Extention 72°C 45Sec
۴۰ مرتبه تکرار سیکل	
	Final extention 72°C 5min
-1659 C/T (RFLP)	Long denaturation 95°C 5min
	1. Denaturation 95°C 30Sec
	2. Annealing 62.5°C 30Sec
	3. Extention 72°C 45Sec
۴۰ مرتبه تکرار سیکل	
	Final extention 72°C 5min
+150 C/T (RFLP)	Long denaturation 95°C 5min
	1. Denaturation 95°C 30Sec
	2. Annealing 62°C 30Sec
	3. Extention 72°C 45Sec
۱۰ مرتبه تکرار سیکل	
Touchdown به روش	1. Denaturation 95°C 30Sec
	2. Annealing 57°C 30Sec
	3. Extention 72°C 60Sec
	۳۰ مرتبه تکرار سیکل
	Final extention 72°C 5min



شکل شماره ۱- الکتروفورز محصولات (Allele Specific) - PCR 1659C/T ژن NOS2A بر روی ژل آکرلامید

پلی مورفیسم موجود در موقعیت 1659C/T با روش PCR-RFLP نیز مورد بررسی قرار گرفت. از تکثیر اولیه این قطعه، باندی به طول 200 جفت باز تشکیل گردید که پس از هضم با آنزیم محدودکننده Fsp BI (Mae I)، در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت CC، محصول PCR به صورت دست نخورده باقی می ماند و در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت TT، ۲ باند و در صورت وجود ژنوتیپ هتروزیگوت CT، ۳ باند بوجود می آمد. شکل شماره ۲ الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آکرلامید ۱۲٪ را نشان می دهد.



شکل شماره ۲- الکتروفورز محصولات PCR-RFLP 1659C/T ژن NOS2A بر روی ژل آکرلامید

پلی مورفیسم موجود در موقعیت 150C/T+ 16 ژن NOS2A به روش RFLP-PCR مورد بررسی قرار

برای الکتروفورز محصولات PCR، در روش PCR-Alelle-Specific، ۱۰ میکرولیتر و در روش PCR-RFLP، ۳ میکرولیتر از محصولات PCR با ۴ میکرولیتر از loading dye مخلوط و درون حفرات ژل آگاروز ۲٪ برده شد. در یکی از حفرات، مارکر وزن مولکولی DNA ریخته شد. ولتاژ مورد استفاده، ۱۰۰ ولت و مدت زمان الکتروفورز، ۶۰ دقیقه بود. برای مشاهده نتایج، ژل بر روی دستگاه UV Transilluminator انتقال داده شد. محصولات حاصل از هضم آنزیمی در روش PCR-RFLP در ژل آگاروز ۳/۵٪ الکتروفورز شدند.

آنالیز آماری اطلاعات حاصل از بررسی فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در بیماران و گروه کنترل با کمک برنامه آماری SPSS-12 با استفاده از آزمون‌های آماری مجذور کای (χ^2) و Fisher's exact انجام گرفت.

یافته‌ها

با انجام آزمایش PCR یک باند به طول 250 جفت باز از تکثیر پرموتر ژن NOS2A و یک باند به طول 100 جفت باز در اثر تکثیر ژن بتا گلوبین (کنترل داخلی) حاصل گردید. شکل شماره ۱ الکتروفورز محصولات

محاسبه شد. نتایج حاصله در جدول شماره ۶ و ۷ به نمایش در آمده‌اند. فراوانی ژنوتیپ‌ها در بیماران و گروه کنترل از تعادل هادری- واینبرگ تبعیت می‌نمود.

جدول شماره ۴- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های 1659C/T- در بیماران و افراد نرمال

ژنوتیپ	بیماران (n=۱۷۶)	کنترل (n=۲۳۲)	P. value
CC	۱۱۳(٪۶۴/۲)	۱۷۴(٪۷۵)	۰/۰۳
CT	۵۵(٪۳۱/۳)	۴۶(٪۱۹/۸)	
TT	۸(٪۴/۵)	۱۲(٪۵/۲)	

جدول شماره ۵- مقایسه فراوانی آلل‌های 1659C/T- در بیماران و افراد نرمال

آلل	بیماران (n=۱۷۶)	کنترل (n=۲۳۲)	P. value
C	۲۸۱(٪۷۹/۸۲)	۳۹۴(٪۸۴/۹)	۰/۱۲
T	۷۱(٪۲۰/۱۷)	۷۰(٪۱۵/۱)	

جدول شماره ۶- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های 150C/T+ در بیماران و افراد نرمال

ژنوتیپ	بیماران (n=۱۷۶)	کنترل (n=۲۳۲)	P. value
CC	۱۳۳(٪۷۵/۶)	۱۶۰(٪۶۹)	۰/۳۳
CT	۳۲(٪۱۸/۲)	۵۲(٪۲۲/۴)	
TT	۱۱(٪۶/۳)	۲۰(٪۸/۶)	

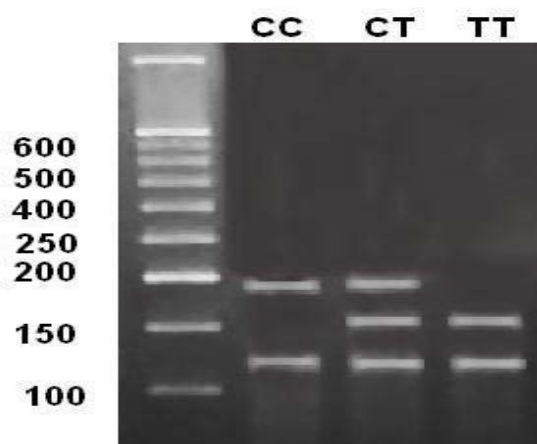
جدول شماره ۷- مقایسه فراوانی آلل‌های 150C/T+ در بیماران و افراد نرمال

آلل	بیماران (n=۱۷۶)	کنترل (n=۲۳۲)	P. value
C	۲۹۸(٪۸۴/۷)	۳۷۲(٪۸۰/۲)	۰/۱۲
T	۵۴(٪۱۵/۳)	۹۲(٪۱۹/۸)	

پرونده کلینیکی بیماران، مورد مطالعه قرار گرفت و میزان پروتئین فازحاد (CRP) سرمی، فاکتور روماتوئید (RF) سرمی، علائم خارج مفصلی (Extra articular manifestation =EAM)، تغییر شکل مفاصل (Deformity)، ندول روماتوئید (Nodule)، خوردگی مفاصل (Erosion)، سرعت رسوب گلبول‌های

گرفت. از تکثیر اولیه این قطعه باندی به طول 275 جفت باز تشکیل گردید که پس از هضم آنزیمی به کمک آنزیم Tsp (EI (Tas I در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت CC، ۲ باند به طول 175 و 113 جفت باز و در صورت وجود ژنوتیپ هموزیگوت TT، ۲ باند به طول 142 و 113 جفت باز و در صورت وجود ژنوتیپ هتروزیگوت CT، ۳ باند به طول 175، 142 و 113 جفت باز بوجود می‌آمد. شکل شماره ۳ الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آکرلامید ۱۲٪ را نشان می‌دهد.

فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در بیماران و گروه کنترل در جدول شماره ۴ و ۵ به نمایش در آمده است. فراوانی ژنوتیپ‌ها در بیماران و گروه کنترل تابع تعادل هادری- واینبرگ (Hardy-Weinberg) بود. در مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های حاصل از پلی مورفیسم 1659C/T- پروموتور ژن NOS2A، در بیماران و گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها مشاهده گردید (به ترتیب $P=۰/۰۳$ و $P=۰/۱۲$). ژنوتیپ CC به طور قابل ملاحظه‌ای در گروه کنترل (٪۷۵) بیشتر از گروه بیمار (٪۶۴/۲) مشاهده شد.



شکل شماره ۳- الکتروفورز محصولات RFLP-PCR 150C/T+ (گزون 16) ژن NOS2A بر روی ژل آکرلامید

فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در بیماران و گروه کنترل با استفاده از تست χ^2 (مجذور کای)، مقایسه و مقادیر ارزشی این مقایسه‌ها به ترتیب $P=۰/۱۱۸$ و $P=۰/۳۳$

پیرایش متناوب mRNA (messenger Ribonucleic acid)، فعالیت و بروز iNOS را تنظیم می‌نمایند.^(۲۱) آنزیم iNOS و mRNA مربوط به آن، بسیار پایدار می‌باشند^(۲۲) و به همین دلیل قادر به تولید مقادیر زیادی NO در طی چندین روز می‌باشند که منجر به تولید میزان زیادی از گونه‌های فعال نیتروژن اکسید (Reactive Nitrogen Oxide Species = RNOS) می‌گردد، که واسطه طیف گسترده‌ای از تأثیرات فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک می‌باشد.^(۲۳) مطالعات ژنتیکی تا حدودی نقش ژن NOS2A را در بروز آرتریت روماتوئید تأیید می‌نمایند. یک مطالعه غربالگری ژنومی گسترده (Genome Wide Screen) در آمریکا، ارتباط معنی‌داری بین برخی نواحی موجود بر روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۱۲، ۱۶ و ۱۷ با بیماری آرتریت روماتوئید را نشان داده است.^(۲۳) ناحیه موجود بر روی کروموزوم RA17، 29 نامیده می‌شود که حاوی میکروساتلیت (D17S1301) می‌باشد که در نزدیکی انتهای تلومریک بازوی بلند کروموزوم ۱۷ قرار گرفته است. ژن NOS2A نیز بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ در نزدیکی سانترومر این کروموزوم (17q11. 2- q12) قرار گرفته است. با توجه به وجود ارتباط بین کروموزوم ۱۷ و آرتریت روماتوئید، در مطالعات غربالگری ژنومی گسترده می‌توان ژن NOS2A را به‌عنوان یک ژن کاندید در بروز این بیماری مطرح نمود. پلی مورفیسم‌های موجود در ناحیه 5' پروموتور ژن NOS2A، میزان بروز آنزیم iNOS را تحت تأثیر قرار می‌دهند.^(۲۴) مطالعات نشان داده‌اند که پلی مورفیسم‌های موجود در ژن NOS2A موجب استعداد ابتلا به بیماری‌های واسکولار، عفونی، التهابی و خودایمن می‌گردند.^(۲۵-۲۸) دو سایت پلی مورفیک در ناحیه فرادست پروموتور با اهمیت عملکردی وجود دارد. یکی از آن‌ها پنتانوکلوئید بسیار پلی مورفیک توالی تکراری n (CCTTT) واقع در 2.5 kb فرادست ژن NOS2A و دیگری تکرار چهار نوکلئوتیدی دو آلی (AAAT/AAAAT) واقع در 0.75 kb فرادست این ژن

قرمز (ESR) و سن شروع بیماری، جمع‌آوری و ثبت گردید. میانگین سن (Deformity)، ندول روماتوئید (Nodule)، خوردگی مفاصل (Erosion)، سرعت رسوب گلبول‌های قرمز (ESR) و سن شروع بیماری، جمع‌آوری و ثبت گردید. میانگین سن شروع بیماری، $35/8 \pm 11/5$ سال و میانگین طول دوره بیماری، $9/3 \pm 6/2$ سال بود. $9/1\%$ بیماران دارای سابقه بیماری در خویشان درجه ۱ و ۲ بودند و $11/9\%$ این بیماران سیگار مصرف می‌نمودند. علائم خارج مفصلی و ندول روماتوئید در این بیماران نادر بود. آنالیز آماری فراوانی ژنوتیپ‌های حاصل از دو پلی مورفیسم مذکور با علائم بیماری و یافته‌های آزمایشگاهی تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. میانگین میزان ESR (Erythrocyte sedimentation rate) در بیماران، $35/18 \pm 22/8$ میلی متر بر ساعت بود. آنالیز آماری با استفاده از تست آنووا یک طرفه (One-Way ANOVA) تفاوت معنی‌داری بین ESR و ژنوتیپ‌های 1659C/T- نشان نداد ($P=0/89$). لیکن تفاوت معنی‌داری بین ESR و ژنوتیپ‌های 150 C/T+ مشاهده گردید ($P=0/01$). هیچ ارتباط معنی‌داری بین سن بروز بیماری و ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم‌های مذکور مشخص نگردید.

بحث

تولید iNOS توسط LPS، IL-1 (Interleukien-1)، TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)، IFN- γ (Interferon- γ)، GM-CSF، PAF (Platelet - activating Factor)، GM-CSF (Granulocyte Monocyte - Colony - Stimulating Factor) و IL-6 فراتنظیم می‌شود. گلوکوکورتیکوئیدها و فاکتور غیر فعال‌کننده ماکروفاژ (Macrophage Deactivating Factor = MDF) IL-10، IL-8، PDGF (Platelet Derivative Growth Factor)، IL-4 (Nitric Oxide) و TGF- β (Transforming Growth Factor- β) تولید آن را مهار می‌نمایند.^(۱۰) بعلاوه برهمکنش‌های پروتئین- پروتئین، تغییرات و اصلاحات پیوندهای کووالان و

می‌باشد.^(۲۹) تفاوت‌های معنی‌داری در فعالیت پروموتور در این دو واریانت یافت شده است. احتمال دارد افراد دارای R4/5 یا AAAT/AAAAT در مقایسه با حاملین R4/4، NO بیشتری تولید نمایند؛^(۲۹،۳۰) بعلاوه این تفاوت‌ها در میزان بروز ژن NOS2A، باعث استعداد ابتلا یا مقاومت به بیماری آرتریت روماتوئید نیز می‌گردد.^(۲۴)

Gay و همکاران (۲۰۰۴)، ارتباط بین پنتا نوکلئوتید بسیار پلی مورفیک (CCTTT)n موجود در پروموتور ژن NOS2A را با بیماری آرتریت روماتوئید بررسی نمودند.^(۲۴) نتایج حاصل از این مطالعه اختلافی بین بیماران مبتلا به این بیماری و گروه کنترل نشان نداد. لیکن ارتباط نسبتاً معنی‌داری بین افزایش فراوانی 10-repeat alleles و بروز بیماری مشاهده شد (P=0.08). از طرفی آلل‌های با کمتر از ۱۲ تکرار، مولد مقادیر کم NO هستند.^(۲۲،۲۵،۲۴) وقتی که آلل‌های ژن NOS2A به دو گروه تکرارهای کمتر و بیشتر از تکرار ۱۲ تقسیم‌بندی شد، اختلاف معنی‌داری بین بیماران و گروه کنترل مشاهده گردید (P=0.021) به‌طوری‌که افراد حامل دو آلل با کمتر از ۱۲ تکرار (low NO producer) دو برابر بیشتر از سایر افراد مستعد پیشرفت این بیماری بودند (P=۰/۰۰۵).^(۲۴) از آنجایی که NO تنظیم‌کننده مهم تعادل Th1/Th2 می‌باشد و پاسخ سایتوکاینی Th1 را سرکوب می‌نماید، در افرادی که حامل دو آلل با کمتر از ۱۲ تکرار هستند، پاسخ‌های ایمنی به سمت پاسخ‌های Th1 متمایل می‌شود؛ لذا این افراد مستعد ابتلا به بیماری‌های خودایمن وابسته به Th1 (مانند آرتریت روماتوئید) می‌باشند.^(۲۴) ممکنست نقش بالقوه آلل‌های با تکرار کوتاه بواسطه دیگر پلی مورفیسم‌هایی باشد که در حرکت ترجیحی با آلل‌های (CCTTT)n بوده و بر روی کروموزوم 17q قرار دارند. مطالعات بیشتر در جمعیت‌های مختلف جهت اثبات قطعی نقش پلی مورفیسم (CCTTT)n ژن NOS2A در آرتریت روماتوئید و ارتباط آن با دیگر ژن‌های درگیر در استعداد ابتلا به بیماری

ضروری است. آنزیم iNOS توسط سایتوکاین‌های پیش التهابی و التهابی القا می‌شود. احتمال دارد که پلی مورفیسم‌های عملکردی موجود در ژن این سایتوکاین‌ها نیز با تأثیر بر افزایش بروز سایتوکاین‌های التهابی و در نتیجه افزایش بروز ژن NOS2A، سبب استعداد ابتلا به بیماری آرتریت روماتوئید گردند؛ برای مثال در مطالعات متعددی نقش پلی مورفیسم‌های موجود در ژن TNF- α در بروز و شدت بیماری آرتریت روماتوئید مشخص شده است.^(۳۲-۳۵) با توجه به نقش این سایتوکاین‌ها در القا ژن NOS2A، با تأثیر بر میزان بروز ژن NOS2A، سبب استعداد یا مقاومت به این بیماری می‌گردند.^(۳۲-۳۵)

یکی از پلی مورفیسم‌های مهم موجود در پروموتور ژن NOS2A، پلی مورفیسم 1659C/T می‌باشد. ارتباط بین این پلی مورفیسم و بیماری مالاریا و عفونت HCV مورد مطالعه قرار گرفته است.^(۲۰،۱۸) رابطه پلی مورفیسم 150C/T+ در اگزوزن ۱۶ ژن NOS2A با دیابت نوع I، سرطان گاستریک و مالتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار گرفته است.^(۳۷،۳۶،۱۵) تاکنون ارتباط پلی مورفیسم‌های 1659C/T- و 150C/T+ ژن NOS2A با بیماری آرتریت روماتوئید بررسی نشده‌اند؛ لذا در این تحقیق ارتباط بین دو پلی مورفیسم مذکور و آرتریت روماتوئید مورد مطالعه قرار گرفته است.

پلی مورفیسم موجود در ناحیه 1659- پروموتور ژن NOS2A باعث تبدیل نوکلئوتید C به نوکلئوتید T می‌شود. این تبدیل اتصال پروتئین‌های هسته‌ای به پروموتور را تحت تأثیر قرار می‌دهد.^(۲۰) Burgner و همکاران در سال ۲۰۰۳ به منظور مطالعه تأثیر پلی مورفیسم 1659C/T- بر روی برهمکنش‌های پروتئین-DNA از رده سلولی شبه ماکروفاژی انسانی به نام HL-60_{hea} (یک چسبنده مشتق از HL-60) استفاده نمودند. LPS موجب القا نسخه‌برداری از ژن NOS2A و سنتز آنزیم iNOS و متعاقباً تولید NO در این رده سلولی می‌شود. در این آزمایش عصاره

نگردید. این موضوع نشان‌دهنده ارجحیت بررسی هاپلوتیپی پروموتور ژن NOS2A می‌باشد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه نمی‌توان پیش‌بینی نمود که کدامیک از آلل‌های حاصل از پلی مورفیسم مذکور با تولید بیشتر یا کمتر NO همراهند.

Burgner و همکاران در سال ۲۰۰۳، ارتباط این پلی مورفیسم و بیماری مالاریای مغزی را در کودکان گامبیایی مورد بررسی قرار دادند^(۲۰) و ارتباط نسبتاً معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مورفیسم و بیماری مالاریا مشاهده نمودند ($P=0/08$). فراوانی آلل T در کودکان مبتلا به مالاریای مغزی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل بیشتر می‌باشد ($P=0/009$). با توجه به آنکه افزایش تولید NO یکی از فاکتورهای مهم جهت استعداد ابتلا به مالاریای مغزی می‌باشد، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که آلل T با افزایش تولید NO، سبب حساسیت به بروز مالاریای مغزی می‌شود و آلل C با کاهش قدرت تولید NO، سبب مقاومت به بروز مالاریای مغزی می‌شود. در مطالعه حاضر فراوانی آلل T در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و گروه کنترل به ترتیب ۲۰/۲٪ و ۱۵٪ می‌باشد؛ لذا می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که فراوانی بیشتر آلل T در بیماران با افزایش تولید NO، سبب افزایش استعداد ابتلا به بروز آرتریت روماتوئید گردیده است. با توجه به حرکت ترجیحی قوی بین سایت‌های پلی مورفیک در پروموتور ژن NOS2A^(۱۸ و ۱۹) پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات آینده، تأثیر پلی مورفیسم 1659C/T- به همراه دیگر پلی مورفیسم‌های موجود در پروموتور ژن NOS2A بر بروز آرتریت روماتوئید مورد مطالعه قرار گیرد.

در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم موجود در موقعیت 150C/T+ اگزون ۱۶ ژن NOS2A با بروز بیماری آرتریت روماتوئید نیز مورد بررسی قرار گرفت. این پلی مورفیسم باعث تبدیل اسید آمین سرین آنزیم iNOS در موقعیت 608 به اسید آمینه لوسین می‌گردد

هسته‌ای سلول‌های تحریک نشده و تحریک شده با LPS (به مدت ۳۰ دقیقه) با یک پروب Oligoduplex حاوی ناحیه NOS2A-1659 انکوبه گردیدند. برای هر دو فرم الی یک کمپلکس پروتئین-DNA مشاهده شد که بدنبال تحریک با LPS به‌طور معنی‌داری فرا تنظیم گردید. از طرفی Burgner و همکاران نشان دادند که کمپلکس‌های ساختاری و القایی شکل گرفته در حضور الل NOS2A-1659C به‌طور قابل توجهی از الل NOS2A-1659T بیشتر می‌باشند؛ بنابراین میزان کمپلکس پروتئین-DNA در سلول‌های در حال استراحت و تحریک شده با LPS در صورت وجود آلل NOS2A-1659T کاهش می‌یابد. در نتیجه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که میزان تولید NO توسط دو آلل فوق متفاوت است.^(۲۰)

با توجه به نقش احتمالی پلی مورفیسم 1659C/T- در بروز آنزیم iNOS و نقش مهم و اساسی NO و آنزیم iNOS در بیماری آرتریت روماتوئید و اهمیت عملکردی پلی مورفیسم 1659C/T-، فراوانی ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی مورفیسم در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و افراد نرمال مورد مقایسه قرار گرفت و پس از تجزیه و تحلیل آماری تنها تفاوت معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌ها در گروه بیمار و کنترل مشاهده گردید ($P=0.03$). این تحقیق اولین مطالعه‌ای است که ارتباط بین پلی مورفیسم 1659C/T- و بیماری آرتریت روماتوئید را نشان می‌دهد؛ پیشنهاد می‌گردد که فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های حاصل از پلی مورفیسم 1659C/T- در جوامع مختلف و تأثیر آن بر بروز روماتوئید آرتریت مورد بررسی قرار گیرد.

Yee و همکاران در سال ۲۰۰۱ ارتباط بین هاپلوتیپ - (1659, -1026, 277) در پروموتور ژن NOS2A و نتیجه عفونت HCV را در بیماران اروپایی ثابت نمودند.^(۲۵) حرکت ترجیحی قوی بین این پلی مورفیسم‌ها وجود دارد. هیچگونه تفاوتی در پراکنش ژنوتیپ‌های مختلف حاصل از پلی مورفیسم 1659C/T- در بیماران مبتلا به عفونت مزمن و خودبه‌خود محدود شونده HCV مشاهده

روماتوئید را بررسی می‌نماید. با توجه به عدم وجود هماهنگی در نتایج حاصله از تأثیر این پلی مورفیسم بر بیماری‌های مختلف (عدم تأثیر بر آرتریت روماتوئید و مالتیپل اسکلروزیس و تأثیر بر بروز سرطان گاستریک) مطالعه تأثیر این پلی مورفیسم بر میزان تولید NO ضروری به نظر می‌رسد.

ارتباط معنی‌داری بین علائم بالینی و پاراکلینیکی و سن بروز بیماری آرتریت روماتوئید و آل‌های +150C/T و -1659C/T ژن NOS2A مشاهده نگردید. لیکن تفاوت معنی‌داری بین ESR بیماران و ژنوتیپ‌های +150 C/T مشاهده گردید ($P=0/01$)، اما به دلیل متفاوت بودن سن بیماران، طول دوره بیماری و اندازه‌گیری ESR در مراحل مختلف بیماری، نیاز به تکرار نتایج حاصل از ارتباط ESR و ژنوتیپ‌های +150 C/T در یک جمعیت هوموژن از بیماران احساس می‌گردد.

نتیجه‌گیری

می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پلی مورفیسم -1659C/T تنها با استعداد ابتلا به بیماری ارتباط دارد. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی جهت القا این آنزیم از محرک‌هایی مثل سایتوکاین‌ها استفاده شود. تعیین میزان بروز iNOS با استفاده از تکنیک‌های چون فلوسایتومتری پیشنهاد می‌شود، تا نقش قطعی پلی مورفیسم‌های موجود در این ژن بر میزان بروز آنزیم بهتر مشخص گردد.

تقدیر و تشکر

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

(Ser⁶⁰⁸ Leu)^(۱۵) که ممکن است در عملکرد آنزیم نقش داشته باشد؛ زیرا اسید آمینه قطبی سرین با گروه R بدون شارژ، به اسید آمینه لوسین با گروه R با شارژ مثبت تبدیل می‌شود. این تبدیل می‌تواند بر اتصال سوبستراها به آنزیم تأثیر داشته باشد.

Johannesen و همکاران در سال ۲۰۰۱ ارتباط بین این پلی مورفیسم و دیابت نوع I را در بیماران دانمارکی گزارش نمودند.^(۱۵) بر اساس نتایج حاصله، انتقال آل T از والدین به فرزندان بیمار بیشتر صورت می‌گیرد. با توجه به آنکه تولید بیشتر NO به بروز دیابت نوع I کمک می‌نماید، بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان چنین عنوان کرد که آل T با تولید بیشتر NO همراه است.^(۱۵)

در مطالعه انجام شده توسط Barcellos و همکاران در سال ۲۰۰۴ ارتباطی بین پلی مورفیسم +150C/T ژن NOS2A و بیماری مالتیپل اسکلروزیس مشاهده نشد؛^(۳۷) بنابراین این پلی مورفیسم در استعداد ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس نقش ندارد.^(۳۷) از طرفی Shen و همکاران در سال ۲۰۰۴ مشاهده نمودند که پلی مورفیسم +150C/T خطر ابتلا به سرطان گاستریک را در بیماران چینی افزایش می‌دهد. در این مطالعه فراوانی ژنوتیپ CC در بیماران و گروه کنترل به ترتیب ۷۲/۵۲٪ و ۷۶/۸٪ گزارش شده است.^(۳۶) تولید NO توسط ماکروفاژهای فعال با ایجاد آسیب در DNA در کارسینوزن نقش دارد. جایگزینی C با T در ژن NOS2A منجر به بروز iNOS در سلول‌های هدف فعال شده می‌گردد که باعث تولید NO در مقادیر بالا می‌شود. بیماران مبتلا به سرطان گاستریک حامل آل T ممکن است میزان تولید NO را در موکوس گاستریک افزایش دهند. نتایج حاصل از مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل نشان نداد ($P=0/33$).

این تحقیق اولین مطالعه‌ای است که ارتباط پلی مورفیسم +150C/T ژن NOS2A و بیماری آرتریت

فهرست منابع

- 1- Kavanaugh AF, Lipsky PE. Rheumatoid arthritis. Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, William T. Shearer, Harry W. Schroeder, Anthony J. Frew, Cornelia M. Weyand, editors. In: *Clinical Immunology Principles and Practice*. 3rd ed. St Louis: Mosby Year Books; 2000. P. 1093–116.
- 2- Steven B Abramson, Ashok R Amin, Robert M Clancy, Makhondan Attur. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Practice & Research Clin Rheumatol* 2001; 15: 831-45.
- 3- Lotz M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheumatic Dis Clin Nor America* 1999; 25: 269-82.
- 4- Hirai Y, Migita K, Honda S, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, et al. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Science* 2001; 68: 913-20.
- 5- Clancy R, Abramson SB, Kohne C, Rediske J. Nitric oxide attenuates cellular hexose monophosphate shunt response to oxidants in articular chondrocytes and acts to promote oxidant injury. *J Cellular Physiol* 1997; 172: 183-91.
- 6- Van't Hof RJ, Hoking L, Wright PK, Ralston SH. Nitric oxide is mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39: 1004-8.
- 7- Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1141-51.
- 8- Grabowski PS, Wright PK, Van 't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovial and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 651-55.
- 9- Stefanovic RM, Stadler J, Evans CH. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1036-44.
- 10- Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-BV. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 147-56.
- 11- Borderie D, Hilliquin P, Hervann A, Kahan A, Menkes CJ, Ekindjian OG. Nitric oxide synthase is expressed in the lymphomononuclear cells of synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 2083-88.
- 12- Anderw PJ, Harant H, Lindley IJ. Up-regulation of interleukin-1 beta stimulated interleukin-8 in human keratinocytes by nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1997; 57: 1423-29.
- 13- St Clair EW, Wilkinson WE, Lang T, Sanders L, Misukonis MA, Gilkeson GS, et al. Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *J Exp Med* 1996; 184: 1173-78.
- 14- Yki JH, Bergholm R, Leirisalo RM. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 630-34.
- 15- Johannesen J, Pie A, Pociot F, Kristiansen OP, Karlens AE, Nerup J. Linkage of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene to Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001; 86: 2792-96.
- 16- Daff S, Sagami I, Shimizu T. The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca²⁺/calmodulin-dependent electron transfer. *J Biol Chem* 1999; 274: 30589–95.
- 17- Venema RC, Sayegh HS, Kent JD, Harrison DG. Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem* 1996; 271: 6435–40.
- 18- Yee LJ, Knapp S, Burgner D, Hennig BJ, Frodsham AJ, Wright M, et al. Inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) haplotypes and the outcome of hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2004; 5: 183-87.
- 19- Annane D, Sanquer S, Sébille V, Faye A, Djuranovic D, Raphaël JC, et al. Compartmentalized inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet* 2000; 355: 1143-48.
- 20- Burgner D, Usen S, Rockett K, Jallow M, Ackerman H, Cervino A, et al. Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Hum Genet* 2003; 112: 379-86.
- 21- Hemmens B, Woschitz S, Pitters E, Klösch B, Völker C, Schmidt K, et al. The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN): characterization of its action on pure nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1998; 430: 397-400.
- 22- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar RT. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory disease. *Mol Med* 2000; 6: 347-73.

- 23- Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Monteiro J, et al. A Genomewide Screen in Multiplex Rheumatoid Arthritis Families Suggests Genetic Overlap with Other Autoimmune Diseases. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 927–36.
- 24- Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sanchez E, Lopez-Nevot MA, Amoli MM, Garcia-Porrua C, et al. Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43:1182-5.
- 25- Warpeha KM, Xu W, Liu L, Charles IG, Patterson CC, Ah-Fat F, et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphism (CCTTT)_n repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J* 1999; 13: 1825-32.
- 26- Morris JB, Glenn LC, Wilcken ELD, Wang LX. Influence of an inducible nitric oxide synthase promoter variant on clinical variables in patients with coronary. *Clin Scie* 2001; 100: 551-56.
- 27- Kumaramanickavel G, Sripriya S, Vellanki RN, Upadyay NK, Badrinath SS, Rajendran V, et al. Inducible nitric oxide synthase gene and diabetic retinopathy in Asian Indian patients. *Clin Genet* 2002; 61: 344-48.
- 28- Morris JB, Markus AM, Glenn LC, Wang LX, et al. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type2 diabetes. *J Mol Med* 2002; 80: 96-104.
- 29- López-Nevot MA, Ramal L, Jiménez-Alonso J, Martín J. The inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism dose not confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42:113-6.
- 30- Zhang W, Kuncewicz T, Yu ZY, Zou L, Xu X, Kone BC. Protein- protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. *Acta Physiol Scand* 2003; 179: 137-42.
- 31- Kunnas TA, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Tanner MM, Laippala P, Penttilä A, et al. A functional variant of the iNOS gene flanking region is associated with LAD coronary artery disease: an autopsy study. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 1032-7.
- 32- Pascual M, López-Nevot MA, Cáliz R, Koeleman BP, Balsa A, Pascual-Salcedo D, et al. Genetic determinants of rheumatoid arthritis: the Inducible nitric oxide synthase (NOS2A) gene promoter polymorphism. *Genes Immun* 2002; 3: 299-301.
- 33- Vandevyver C, Raus P, Stinissen P, Philippaerts L, Cassiman JJ, Raus J. Polymorphism of the tumour necrosis factor beta gene in multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet* 1994; 21: 377–82.
- 34- Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, et al. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1998; 4: 724–33.
- 35- Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, et al. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol* 1997; 36: 516–21.
- 36- Shen J, Wang RT, Wang LW, Xu YC, Wang XR. A novel genetic polymorphism of inducible nitric oxide synthase is associated with an increased risk of gastric cancer. *World J Gastroentrol* 2004; 10: 3278-83.
- 37- Barcellos LF, Begovich AB, Reynolds RL, Caillier SJ, Brassat D, Schmidt S, et al. Linkage and association with the NOS2A locus on chromosome 17q11 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2004; 55: 793-800.

Study of NOS2A Gene Polymorphism in Rheumatoid Arthritis Patients and Normal Individuals

*B. Abd Nikfarjam, MSc^I Z. Amirghofran, PhD^{II}
E. Aflaki, MD^{III} E. Kamali Sarvestani, PhD^{II}

Abstract

Background & Aim: Several lines of evidence have indicated that NO might be important in the pathogenesis of RA. NO could be synthesized by an enzyme called inducible nitric oxide synthase (iNOS). iNOS is expressed in the synovium, cartilage and lymphomononuclear cells of synovial fluid and lymphocytes and monocytes of peripheral blood of RA patients. Several studies have shown that iNOS gene (NOS2A) polymorphisms have been associated with a number of inflammatory and autoimmune diseases. In the present study the frequency of NOS2A gene polymorphism at positions -1659 C/T and +150 C/T was investigated in patients with RA and control subjects.

Material and Method: In the present case-control study the frequency of NOS2A gene polymorphisms at positions -1659 C/T and +150 C/T was investigated in 176 patients with RA and 232 control subjects using PCR-Allele specific and PCR-RFLP methods, respectively. SPSS version 10, Chi-square and Fisher's exact tests were used to study the differences in genotype and allele frequencies between patients and controls.

Results: The results of the present study showed a significant difference in NOS2A -1659 C/T polymorphism between the patients and controls ($P=0.03$). Wild type homozygote (CC) was significantly higher in normal subjects (75%) than patients (64.2%). No significant difference was observed between RA patients and controls in NOS2A +150 C/T polymorphism ($P=0.33$). Furthermore, there was no significant association between different clinical and paraclinical findings including erosion, deformity of joints, rheumatoid nodules, extra articular manifestations, CRP, RF and age of onset and -1659 C/T and +150 C/T NOS2A gene polymorphisms.

Conclusion: To the best of our knowledge this study was the first research on the NOS2A gene polymorphisms in RA patients. Our results revealing the significant correlation between -1659 C/T genotypes and RA, indicates the importance of iNOS polymorphism in the patients and suggest further studies in other ethnic groups.

Key Words: 1) Rheumatoid Arthritis (RA) 2) Inducible Nitric Oxide Synthase
3) Nitric Oxide Synthase 2A Gene Polymorphism

This article is an abstract of Ms. Abd Nikfarjam's thesis advised by Dr. Amirghofran and read by Dr. Kamali and Dr. Aflaki in partial fulfillment of an Ms degree in immunology.

I) MSc in Immunology. Instructor. Department of Immunology and Microbiology. Faculty of Medicine. Shahid Bahonar Ave., Qazvin University of Medical Sciences and Health Services. Qazvin, Iran. (*Corresponding Author)

II) Professor of Immunology. Department of Immunology. Research Center of Auto-immune Diseases. Faculty of Medicine. Shiraz University of Medical Sciences and Health Services. Shiraz, Iran.

III) Assistant Professor of Rheumatology. Shiraz University of Medical Sciences and Health Services. Shiraz, Iran.