

دانشور

پزشکی

بررسی فراوانی پلی مورفیسم ژن های گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD)، ایدورونات-۲- سولفاتاز (IDS) و پروتئین پالمیتوئیل غشایی (P55) در خانم های نرمال و بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML)

نویسندگان: سعید کاویانی^۱، دکتر یوسف مرتضوی^{۲*}، دکتر علی اکبر پورفتح الله^۳، دکتر کامران علی مقدم^۴، دکتر زهرا ذنوبی^۵، مسعود سلیمانی^۱، دکتر انوشیروان کاظم نژاد^۶ و دکتر اردشیر قوام زاده^۷

۱. دانشجوی دکتری گروه هماتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
 ۲. استادیار گروه هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
 ۳. استاد گروه هماتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
 ۴. استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۵. استادیار بخش زنان و مامایی بیمارستان بوعلی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
 ۶. دانشیار گروه آمارزیستی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
 ۷. استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- * نویسنده مسئول: Email: kavianis@modares.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: غیرفعال شدن کروموزوم X به طور گسترده برای تشخیص افتراقی هیپریلازی واکنشی از ارتشاح سلول های بدخیم که ناشی از ایجاد موتاسیون سوماتیک در برخی از ژن ها است، مورد استفاده قرار می گیرد. در صورتی که امکان بررسی شاخص های اختصاصی سرطانی وجود نداشته باشد ارزیابی غیرفعال شدن کروموزوم X در بدخیمی های انسانی قابل استفاده است.

برای این منظور افراد مؤنثی مورد مطالعه قرار می گیرند که برای یکی از ژن های وابسته به کروموزوم X هتروزیگوت باشند. بیش تر محققین از پلی مورفیسم های موجود بر روی DNA استفاده کرده، الگوی غیرفعال شدن کروموزوم X را با استفاده از بررسی الگوی متیلاسیون DNA گزارش کرده اند، حال آن که متیلاسیون DNA همیشه با غیرفعال شدن کروموزوم X مرتبط نیست.

روش بررسی: برای مطالعه الگوی غیرفعال شدن کروموزوم X در بدخیمی های خونی، ابتدا باید میزان شیوع ژن های پلی مورفیک وابسته به این کروموزوم را در جامعه به دست آورد. لذا در این مطالعه، شیوع پلی مورفیسم ژن های G6PD، IDS و P55 را در سطح DNA در ۱۷۰ نفر خانم نرمال و ۳۵ نفر از خانم های مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی (AML) مورد بررسی قرار دادیم.

نمونه DNA از خون محیطی استخراج و توسط پرایمرهای اختصاصی PCR گردید. محصولات PCR توسط آنزیم های برش زننده هضم گردیدند و الگوی همو و یا هتروزیگوت به دست آمده تفسیر شد.

یافته ها: میزان شیوع هتروزیگوسیته برای ژن P55 در خانم های مورد مطالعه ۴۸/۵ درصد (۱۱۴/۲۳۵) بود. ۳۹/۵ درصد (۹۳/۲۳۵) از افراد برای ژن IDS و ۲۸/۹ درصد (۶۸/۲۳۵) برای ژن G6PD هتروزیگوت بودند. لازم به ذکر است تعدادی از افراد مورد مطالعه برای بیش از یک ژن هتروزیگوت بودند.

نتیجه گیری: شیوع هتروزیگوسیته برای ژن های پلی مورفیک فوق الذکر تقریباً مشابه نتایج به دست آمده در مطالعات انجام شده در سایر کشورها است. از این رو می توان نتیجه گیری کرد که ارزیابی این ژن های پلی مورفیک می تواند برای مطالعه غیرفعال شدن کروموزوم X در جمعیت خانم های ایرانی مبتلا به بیماری های بدخیم خونی مفید باشد.

واژه های کلیدی: ژن های P55، IDS، G6PD، غیرفعال شدن کروموزوم X و هتروزیگوسیته

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال سیزدهم - شماره ۵۹
آبان ۱۳۸۴

تاریخ وصول: ۸۲/۱۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۸۳/۹/۱۰

مقدمه

هنگامی که ناهنجاری‌های کروموزومی و یا جهش سوماتیک در یک سلول ایجاد شود، آن سلول و سلول‌های تولید شده از آن ممکن است حاوی مزیت تکثیر، رشد یا بقا شوند که در نتیجه، یک کلون سلولی غیرطبیعی ایجاد می‌گردد. اگر این کلون بر خون‌سازی غالب گردد و اکثر سلول‌های تولیدی دارای نقصی مشابه باشند، اصطلاحاً به آن «خون‌سازی کلونال» اطلاق می‌گردد [۲، ۱]. از این رو بررسی و تجزیه و تحلیل الگوی خون‌سازی نقش بسیار مهمی در تشخیص بدخیمی‌ها دارد [۳، ۲، ۱]. آنالیز الگوی خون‌سازی به منظور تشخیص اختلالات دارای الگوی پلی کلونال غیربدخیم از تکثیر نئوپلاستیک که الگوی منوکلونال نشان می‌دهد، قابل استفاده است. این تکنیک در مورد بیش تر خانم‌ها کاربرد دارد. ارزیابی الگوی غیرفعال شدن کروموزوم X بخصوص برای ناهنجاری‌هایی که فاقد مارکرهای سرطانی اختصاصی قابل ردیابی هستند، می‌تواند مفید باشد [۵، ۴، ۲، ۱].

یکی از راه‌های تشخیص بدخیمی واقعی از حالت هایپرپلازی خوش‌خیم، ارزیابی غیرفعال شدن کروموزوم X است. بیش تر محققین برای این منظور از پلی مورفیسم ژن‌های فسفوگلیسرات کیناز (PGK)، هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HPR) و گیرنده آندروژن انسانی (HUMARA) استفاده کرده‌اند. مطالعه این ژن‌ها نیازمند بررسی متیلاسیون در سطح DNA است [۵-۱]. یکی دیگر از معایب روش بررسی متیلاسیون، عدم ارتباط غیرفعال شدن کروموزوم X با الگوی متیلاسیون DNA در برخی از نمونه‌ها است؛ از جمله گزارش‌هایی مبنی بر تغییر الگوی متیلاسیون در سلول‌های سرطانی به علت شیمی‌درمانی وجود دارد [۶]. گیل (Gale) و همکاران او گزارش کردند ۶۸ درصد خانم‌ها برای ژن‌های گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD)، ایدورونات-۲- سولفاتاز (IDS) و پروتئین پالمیتوئیل‌غشایی (P55) هتروزیگوت هستند [۱]. در یک بررسی مقایسه‌ای بین جمعیت خانم‌های ایرانی و

انگلیسی از نظر شیوع پلی مورفیسم ژن G6PD (نوکلئوتید ۱۳۱۱ C/T) که توسط مرتضوی و همکارانش انجام گرفت، درصد هتروزیگوسیته ژن فوق در دو گروه به ترتیب ۴۴ درصد و ۲۴ درصد گزارش گردید [۲]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط همین محقق بر روی بیماران آنمی آپلاستیک و افراد نرمال جامعه انگلیسی از نظر شیوع پلی مورفیسم ژن G6PD (نوکلئوتید ۱۳۱۱ C/T) و IDS (نوکلئوتید ۴۳۸ C/T) انجام گرفت مشخص شد که ۴۳ درصد از افراد برای ژن IDS هتروزیگوت هستند [۴]. هدف از مطالعه حاضر، تعیین شیوع هتروزیگوسیته هر یک از ژن‌های IDS، G6PD و P55 در تعدادی از خانم‌های نرمال و یا مبتلا به AML توسط تکنیک PCR است. نتیجه این مطالعه، مقدمه‌ای برای بررسی الگوی خون‌سازی در بدخیمی‌های خونی خواهد بود.

روش کار

نمونه‌گیری

برای بیماران AML، نمونه‌گیری از ۳۵ بیمار خانم مبتلا به AML جدید بدون هیچ سابقه قبلی از MDS یا بدخیمی‌های خونی دیگر که به بیمارستان‌های شریعتی و امام خمینی (ره) تهران مراجعه کرده بودند انجام گرفت. همچنین نمونه خون خانم‌های نرمال از بخش زنان بیمارستان بوعلی تهران تهیه شد. از هر خانم نرمال یک آزمون شمارش سلولی (CBC) تهیه گردید و تعداد سلول‌های خونی، هموگلوبین و هماتوکریت مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام اندیس‌های خونی برای افراد مورد مطالعه در محدوده نرمال قرار داشت. سن افراد بیمار و نرمال در محدوده ۲۰ تا ۴۵ سال بود. از هر فرد نرمال یا بیمار مقدار ۵ میلی‌لیتر خون محیطی بر روی ماده ضدانعقاد EDTA گرفته شد. DNA از خون تام در عرض مدت کم‌تر از چند ساعت استخراج گردید. DNA به دست آمده تا استفاده در دمای ۲۰ °C قرار داده شد.

جدول ۱: نام ژن و توالی پرایمرهای مورد استفاده

UD: upstream DNA; DD: downstream DNA; UDA: upstream DNA-A; DDM: downstream DNA-M; S-F: sense-F; AS-M: anti-sense-M

نام ژن	توالی پرایمرها ۵' ۳'	طول قطعه (bp)	آنزیم برش زننده
IDS UD	CCCCAAGAAGGGAGGGTCC -3' 5'-G	۱۶۰	BclI
DD	5'TGGAAAAGACCAGCTATACGGAGAATGAT-3'	۱۹۱	Bsh1236 I
P55 UDA	5'- CTCCTCAAAGCAGGCTTCATGCCTG-3'	۲۰۳	BclI
DDM	5'CGTACAGGACTGTTTTTCATTCAGCTTCCG-3'		
G6PD S-F	5'-TGTTCCTCAACCCCGAGGAGT-3'		
AS-M	5'-AAGACGTCCAGGATGAGGTGATC-3'		

در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از محلول تریس یک مولار (pH=۷/۵) به نمونه اضافه کرده، به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی که حاوی DNA است به میکروتیوب جدید منتقل گردید. DNA تمام نمونه‌ها در حرارت ۲۰°C- نگهداری گردیدند.

پرایمرها

نام و توالی پرایمرهای اختصاصی برای هر یک از ژن‌های پلی‌مورفیک P55، IDS و G6PD و طول باند تکثیر شده توسط PCR و نام آنزیم برش زننده در جدول ۱ آورده شده است.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

ناحیه پلی‌مورفیک هر یک از ژن‌های P55، IDS و G6PD توسط پرایمرهای اختصاصی PCR شدند. برای هر نمونه PCR مخلوطی از اجزای زیر داخل یک لوله ۰/۵ میلی‌لیتری ریخته شد:

۵ میکرولیتر از بافر ۱۰ بار غلیظ شده (محتوی کلرید منیزیم)، ۱۵ میکرومول از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشتی، ۲۰۰ میکرومول از مخلوط dNTP، یک

استخراج DNA

استخراج DNA توسط روش‌های جوشانیدن و کیت QIAGEN (آلمان) انجام شد. با توجه به کمیت و کیفیت مناسب DNA حاصل برای انجام PCR و نیز سرعت بالا و ارزان تر بودن مواد مصرفی برای استخراج DNA در بیش تر نمونه‌ها از روش جوشانیدن استفاده شد.

استخراج DNA با روش جوشاندن

۰/۵ میلی‌لیتر خون در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر اپندورف ریخته شد. سپس ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده RBC به آن افزوده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۲ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ شد.

محلول رویی را که حاوی RBC لیز شده و پلاسما است دور ریخته، مجدد حدود ۰/۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده به میکروتیوب افزوده و با دور ۶۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید. این مرحله ۲-۳ مرتبه تکرار شد تا رسوب کاملاً سفید رنگ به دست آمد.

سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سود ۵۰ میلی‌مولار به رسوب اضافه کرده، پس از مخلوط کردن مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰°C بن‌ماری قرار داده شد تا سلول‌ها لیز شوند.

پس از الکتروفورز محصولات هضم شده، توسط دستگاه Gel.doc شرکت بیوراد (Bio Rad)، آلمان از ژل عکس گرفته می شد.

نتایج

در این مطالعه ۲۰۵ نمونه خون تهیه شده از خانم های نرمال و بیمار از نظر وجود و شیوع پلی مورفیسم ژن های G6PD، IDS و P55 مورد بررسی قرار گرفتند.

شیوع پلی مورفیسم ژن P55: با استفاده از پرایمرهای UDA و DDM مشخص گردید که ۱۱۴ نمونه از ۲۳۵ نمونه مورد آزمایش هتروزایگوت هستند؛ یعنی در نوکلئوتید شماره ۳۵۸ برخی افراد، هم دارای آلل T (۱۹۱bp) هستند و هم دارای آلل G (۱۷۸ bp) (شکل ۲و۱). در نتیجه شیوع هتروزایگوسیته برای این ژن ۴۸/۵ درصد به دست آمد.

شیوع پلی مورفیسم ژن IDS: با استفاده از پرایمرهای UD و DD مشخص گردید که ۹۳ نفر از ۲۳۵ نفر مورد آزمایش برای این ژن هتروزایگوت هستند؛ یعنی در نوکلئوتید شماره ۴۳۸ برخی افراد همزمان دارای آلل T (۱۶۰bp) و آلل C (۱۳۰bp) هستند (شکل ۴و۳). شیوع هتروزایگوسیته برای این ژن ۳۹/۵ درصد است.

شیوع پلی مورفیسم ژن G6PD: ۶۸ نفر از ۲۳۵ نفر مورد آزمایش برای این ژن هتروزایگوت هستند؛ یعنی در نوکلئوتید شماره ۱۳۱۱ برخی افراد دارای آلل bp) T (۲۰۳) و همزمان آلل C (۱۸۰bp) هستند (شکل ۵ و ۶). شیوع هتروزایگوسیته برای این ژن ۲۸/۹ درصد به دست آمد.

همچنین میزان شیوع آلل های T در ژن های P55، IDS و G6PD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که شیوع آلل T در ژن P55 افراد مورد مطالعه ۴۱ درصد و شیوع آلل T برای ژن IDS ۲۶ درصد است. همچنین شیوع آلل T برای ژن G6PD ۲۵ درصد است.

واحد آنزیم تک پلی مرز و ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانوگرم از نمونه DNA.

حجم کلی واکنش توسط آب مقطر به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس نمونه ها در ترمال سایکلر اپندورف (آلمان) قرار داده شدند تا DNA طبق برنامه مشخص تکثیر شود.

شرایط انجام PCR برای هر کدام از ژن های فوق بدین شرح است:

ابتد هر نمونه به مدت ۵ دقیقه در حرارت 95°C قرار داده می شد. سپس ۴۵ ثانیه در دمای 95°C و مدت ۴۵ ثانیه در دمای 66°C ، 58°C و یا 65°C به ترتیب برای ژن های IDS، G6PD و P55 قرار می گرفت و آنگاه یک دقیقه در حرارت 72°C نگهداری می شد. این شرایط برای ۳۵ سیکل تکرار می گردید. سپس در انتها و برای تکمیل واکنش پلیمرزاسیون نمونه ها به مدت ۵ دقیقه برای یک دور در دمای 72°C انکوبه می شدند.

بررسی محصولات PCR

پس از انجام PCR مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR با ۲ میکرولیتر از بافر لکه گذاری درون هر چاهک ژل آگاروز سه درصد حاوی اتیدیوم بروماید که از قبل تهیه شده بود برای مدت ۳-۱/۵ ساعت در ولتاژ ۱۰۰-۶۰ الکتروفورز می شدند.

هضم محصولات PCR ژن های IDS، G6PD و P55

برای این منظور، مقدار ۱۶ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR به همراه ۲ میکرولیتر بافر (۱۰ بار غلیظ شده) و ۲ میکرولیتر آنزیم برش زننده (طبق جدول ۱) درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته می شد. سپس لوله های حاوی محصولات ژن های IDS و G6PD به مدت یک ساعت در حرارت 55°C انکوبه می گردید. محصولات هضم شده را بر روی ژل آگاروز متافور (Metaphor) ۳ درصد (حاوی اتیدیوم بروماید) در شرایط ولتاژ ۶۰ به مدت ۱/۵-۲ ساعت الکتروفورز می کردیم. برای هضم محصولات PCR ژن P55، نمونه ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردیدند.

جدول ۲: شیوع هتروزایگوسیتی در افراد نرمال مورد مطالعه

نام ژن	G6PD	P55	IDS
هتروزایگوت	آلل C+T (٪۲۹) ۵۸	آلل G+T (٪۴۸/۵) ۹۷	آلل C+T (٪۳۹) ۷۸
هموزایگوت	آلل C (٪۵۹) ۱۱۸ آلل T (٪۱۲) ۲۴	آلل G (٪۳۶) ۷۲ آلل T (٪۱۵/۵) ۳۱	آلل C (٪۵۶/۵) ۱۱۳ آلل T (٪۴/۵) ۹
جمع	۲۰۰ (٪۱۰۰)	۲۰۰ (٪۱۰۰)	۲۰۰ (٪۱۰۰)

جدول ۳: شیوع هتروزایگوسیتی در بیماران مورد مطالعه

نام ژن	G6PD	P55	IDS
هتروزایگوت	آلل C+T (٪۲۸/۵) ۱۰	آلل G+T (٪۴۸/۵) ۱۷	آلل C+T (٪۴۲/۸) ۱۵
هموزایگوت	آلل C (٪۵۷/۱) ۲۰ آلل T (٪۱۴/۴) ۵	آلل G (٪۲۸/۵) ۱۰ آلل T (٪۲۲/۸) ۸	آلل C (٪۴۲/۸) ۱۵ آلل T (٪۱۴/۴) ۵
جمع	۳۵ (٪۱۰۰)	۳۵ (٪۱۰۰)	۳۵ (٪۱۰۰)

بحث

بررسی الگوی خون سازی نقش مهمی در تشخیص بدخیمی‌ها دارد. این مسأله خصوصاً به منظور تشخیص موارد پلی کلونال و غیربدخیم از تکثیر سلول‌های نئوپلاستیک کلونال که استعداد بدخیم شدن را دارند حائز اهمیت است. روش‌های متعدد ارزیابی کلونالیتی هم اکنون در دسترس است و برای تعیین کلونالیتی یک جمعیت سلولی، به ما کمک می‌کنند [۲، ۴، ۵].

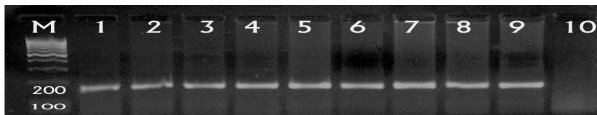
معمولاً برای بررسی خون سازی و پیگیری فرایند درمان در بدخیمی‌ها از مارکرهای خاص سرطانی استفاده می‌شود. در صورت عدم وجود مارکرهای خاص، بررسی الگوی غیرفعال شدن کروموزوم X با استفاده از پلی مورفیسیم‌های موجود بر روی DNA و یا RNA می‌تواند کمک کننده باشد. ژن‌های متعددی با درجات مختلف هتروزایگوسیتی بر روی کروموزوم X در افراد مؤنث گزارش شده است. از میان ژن‌های پلی مورفیک می‌توان از PGK، HPRT، HUMARA،

G6PD، IDS و P55 نام برد. اما میزان شیوع پلی مورفیسیم برای هر ژن در هر جامعه و یا هر گروه نژادی خاص متفاوت است. لذا در هر جامعه فقط یک یا چند ژن قابل استفاده هستند [۶-۱].

برای ارزیابی ژن‌های پلی مورفیک به منظور بررسی کلونالیتی در بدخیمی‌ها از روش‌های PCR و یا ساترن بلاتینگ استفاده می‌شود. آنالیز DNA با استفاده از ژن‌های HPRT و PGK برای ارزیابی الگوی غیرفعال شدن کروموزوم X توسط وگلشتاین (Vogelstein) و همکارانش در سال ۱۹۸۷ برای تشخیص کروموزوم X فعال از غیرفعال استفاده شد. آن‌ها در این روش از ساترن بلات و پروب‌های رادیواکتیو استفاده کردند. همچنین از پروب M27B که یک سکوانس پلی مورفیک DNA است استفاده شده است؛ اما این روش‌ها وقت گیر بوده، نیاز به مقدار زیادی DNA دارد [۱ و ۲]. برخی از محققین از ژن HUMARA که دارای درجه بالای پلی مورفیسیم است استفاده کرده‌اند؛ اما اشکال این روش، ایجاد باندهای سایه است که تشخیص آن را از

درصد (۶۸/۲۳۵) از خانم های تحت بررسی برای ژن G6PD هتروزیگوت بودند؛ یعنی ۶۸ نفر در نوکلئوتید ۱۳۱۱ آلل T و C داشتند. در مطالعه ای توسط مرتضوی و همکارانش شیوع هتروزیگوسیتی برای جمعیت مشهدی ۴۴ درصد و برای جمعیت انگلیسی ۲۲/۳ درصد به دست آمد [۴]. علت اختلاف در شیوع می تواند بافت جمعیتی و یا گروه نژادی خاص باشد. هر چند حجم نمونه مورد بررسی نیز در میزان شیوع هتروزیگوسیتی اهمیت دارد. مطالعه فوق بر روی ۵۰ نفر از افراد مؤنث نرمال انجام گرفته بود که به نظر می رسد حجم نمونه در میزان شیوع تأثیر داشته است. همچنین کلیه افراد مورد مطالعه از منطقه مشهد بوده اند که به این خاطر نقش ژنتیک را نیز باید در نظر داشت. اما در تحقیق ما افراد مورد مطالعه ساکن نقاط مختلف تهران بوده اند که جمعیت ناهمگنی را تشکیل می دهند. در مطالعه حاضر، شیوع هتروزیگوسیتی برای ژن های پلی مورفیک IDS، P55 و G6PD تقریباً مشابه نتایج به دست آمده در مطالعات انجام شده در سایر کشورها است [۱].

از نتایج این تحقیق می توان نتیجه گرفت که با مطالعه ژن های مذکور، بیش از ۷۰ درصد افراد مؤنث حداقل برای یکی از ژن های فوق هتروزیگوت هستند. از این رو، ارزیابی ژن های پلی مورفیک فوق در سطح RNA می تواند در مطالعات غیرفعال شدن کروموزوم X در بیماران مؤنث مبتلا به بدخیمی های خونی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱: محصولات PCR ژن IDS با استفاده از پرایمرهای IDS/UD و IDS/DD توضیح: ستون ۱ تا ۹ محصولات تکثیر ژن IDS را نشان می دهند. سایز باندها ۱۶۰ نوکلئوتید است. ستون M نشان دهنده سایز مارکروستون ۱۰ کنترل منفی (بدون DNA) است.

باند اصلی DNA مشکل می کند. همچنین در ژن های فوق نقاط پلی مورفیک فقط بر روی DNA وجود داشته، در RNA وجود ندارند [۵-۱].

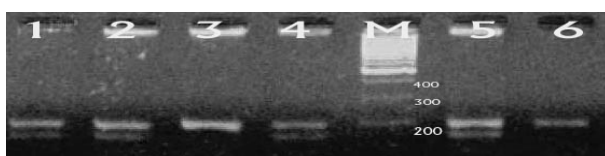
اخیراً برای بررسی مستقیم بیان نسبی دو آلل تعدادی از تکنیک ها معرفی شده اند که قادرند در سطح الگو برداری، مشکلات پیچیده الگوهای متیلاسیون DNA را برطرف کنند. ژن هایی برای این بررسی ها مناسب هستند که دارای پلی مورفیسم در توالی کدکننده RNA باشند. تاکنون در چندین ژن، این جهش ها معرفی شده اند. این ژن ها جزء House keeping genes هستند که در بافت های مختلف بروز می کنند. برخی از این ژن ها عبارتند از: پلی مورفیسم C/T در نوکلئوتید ۱۳۱۱ ژن G6PD، پلی مورفیسم C/T در ژن IDS و پلی مورفیسم G/T در ژن P55 [۱].

لذا ما در این مطالعه به بررسی ژن هایی پرداخته ایم که نقاط پلی مورفیک علاوه بر DNA بر روی RNA نیز وجود دارد. از این رو به طور مستقیم فعالیت کروموزوم X قابل بررسی است.

میزان شیوع هتروزیگوسیتی برای ژن P55 در خانم های مورد مطالعه در این تحقیق ۴۸/۵ درصد (۱۱۴/۲۳۵) به دست آمد؛ یعنی ۱۱۴ نفر در نوکلئوتید شماره ۳۵۸ به طور همزمان دارای آلل T و G بودند. در تحقیق دیگری که توسط لوهوی (Luhovy) و همکارانش انجام گرفته، میزان هتروزیگوسیتی ژن P55 نیز ۴۸ درصد گزارش شده است [۸]. همچنین ۹۳/۲۳۵ (۳۹/۵) درصد از افراد برای ژن IDS هتروزیگوت بودند. ال-کاسار (El-Kassar) و همکاران او و هوپوود (Hopwood) و همکارانش میزان هتروزیگوسیتی حدود ۵۰ درصد را برای ژن IDS گزارش کرده اند [۹]. مرتضوی و همکاران او در مطالعه ای بر روی جمعیت سفیدپوست انگلیسی، میزان هتروزیگوسیتی را برای ژن IDS ۴۳ درصد گزارش کرده اند [۲]. این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعه ما همخوانی دارد و می توان نتیجه گیری کرد که ژن IDS در جمعیت های مختلف نژادی از پلی مورفیسم بالایی برخوردار است. ۲۸/۹



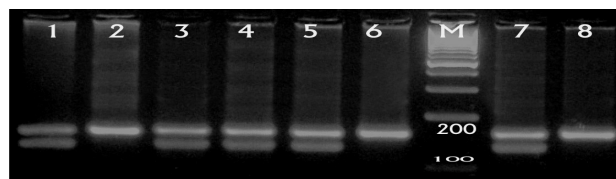
شکل ۵: محصولات PCR برای ژن G6PD با استفاده از پرایمرهای G6PD/AS-M و G6PD/S-F توضیح: ستون ۱ تا ۸ محصولات PCR ژن G6PD را نشان می‌دهند. سایز باندها ۲۰۳ bp است. ستون M سایز مارکر ۱۰۰bp است. ستون شماره ۹ کنترل منفی (بدون DNA) است.



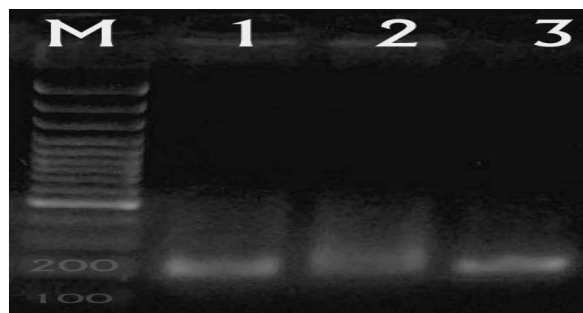
شکل ۶: هضم محصولات ژن G6PD توسط آنزیم Bcl-I توضیح: ستون ۱، ۲ و ۴ دو باند ۲۰۳ bp و ۱۸۰bp را نشان می‌دهند که دلیل بر هتروزیگوت بودن نمونه DNA است. ستون ۳ یک باند ۲۰۳ bp را نشان می‌دهد که دلیل بر هموزیگوت بودن نمونه DNA است. ستون ۶ و ۷ کنترل مثبت و کنترل منفی (فرد سالم) هستند. ستون M نشانگر سایز مارکر ۱۰۰bp است.

تشکر و سپاسگزاری

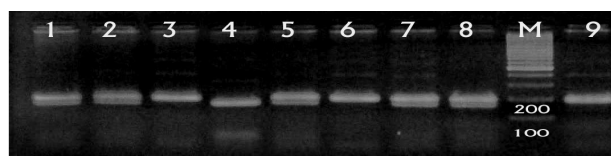
از مسئولین محترم دانشگاه تربیت مدرس، معاونت محترم تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، و دانشگاه علوم پزشکی زنجان به خاطر فراهم کردن امکانات انجام این تحقیق و نیز از کلیه افرادی که نمونه خون خود را برای این مطالعه در اختیار ما قرار دادند، تشکر و قدردانی می‌گردد.



شکل ۴: هضم محصولات PCR ژن IDS توسط آنزیم Bcl I توضیح: ستون ۱، ۳، ۴ و ۵ دو باند ۱۶۰bp و ۱۳۰ bp را نشان می‌دهند که دلیل بر هضم محصولات PCR توسط آنزیم و نشان دهنده هتروزیگوت بودن نمونه DNA است. ستون ۲ و ۶ فقط یک باند ۱۶۰ bp را نشان می‌دهند که دلیل بر هموزیگوت بودن نمونه DNA است. ستون M سایز مارکر ۱۰۰bp است. ستون ۷ و ۸ کنترل مثبت و کنترل منفی (فرد سالم) هستند.



شکل ۳: محصولات PCR برای ژن P55 استفاده از پرایمرهای P55/DDM و P55/UDA توضیح: ستون ۱ تا ۳ محصولات PCR ژن P55 را نشان می‌دهند. سایز باندها ۱۹۱ bp و ستون M سایز مارکر است.



شکل ۴: هضم محصولات PCR ژن P55 توسط آنزیم Bsh1236-I توضیح: ستون ۱، ۲، ۵، ۷ و ۸ دو باند ۱۹۱ bp و ۱۷۸bp را نشان می‌دهند که دلیل بر هتروزیگوت بودن نمونه DNA است. ستون ۳ و ۶ فقط یک باند ۱۹۱ bp و ستون ۴ فقط یک باند ۱۷۸ bp را نشان می‌دهند که دلیل بر هموزیگوت بودن نمونه DNA است. ستون M 100bp است.

منابع

- Gale R.E., Evaluation of clonality in myeloid stem-cell disorders, *Seminars in Hematology* 1999; 36(4):361-372.
- Mortazavi Y., Chopra R., Gordon-smith E.C., Rutherford T.R.; Clonal pattern of x-chromosome inactivation in female patients with aplastic anemia studied using a novel reverse transcription polymerase chain reaction method. *Eur J Hematol* 2000; 64:385-395.
- Carrel L., Cattle A.A., Goglin K.C., Willard H.F., A first-generation X-inactivation profile of the human x chromosome, *PNAS* 1999;96(25):14440-14444.
- Mortazavi Y., Chopra R., Gordon-Smith E.C., Rutherford T.R., Frequency of G6PD nt 1311 C/T polymorphism in English and Iranian populations: relevance to studies of X chromosome inactivation, *J. Med. Gen.* 1997; 34(12):1028-1029
- Gale R.E., Linch D.C.; Clonality studies in acute myeloid leukemia *Leukemia* 1998; 12(2):117-120.
- El Kassab N., Hetet G., Briere J. and Grandchamp B., X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms, *Clinical Chemistry* 1998; 44(1):61-67.
- Fialkow P.J., Singer J.W., Raskind W.H., Adamson J.W., Jacobson R.J., Bernstein I.D., Dow L.W., Najfeld V., Veith R.; Clonal development, Stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia, *N Engl J Med* 1987; 317(8):468-473.
- Jinnai I., Nagai K., Yoshida S., Toyoda A., Marohashi I., Bessho M., Miyawaki S., Toyoma K., Tomonaga M., and Hirashima K.; Incidence and characteristics of clonal hematopoiesis in remission of AML in relation to morphological dysplasia. *Leukemia* 1995; 9:1756-1761.
- Gale R.E., Wheadon H., Goldston A.H., Burnett A.K., Linch D.C.; Frequency of clonal remission in acute myeloid leukemia, *Lancet* 1993; 341:138 - 142.
- Harrison C.N., Gale R.E., Linch D.C., Quantification of X-chromosome inactivation Patterns using RT-PCR of the polymorphic IDS gene and correlation of results obtained with DNA-based techniques. *Leukemia* 1998; 12:1834-39.
- Gale R.E., Mein C.A., Linch D.C., Quantification of X-chromosome inactivation patterns in haematological samples using the DNA PCR – based HUMARA assay, *Leukemia* 1996; 10:362-367.
- Busque L. and Gilliland D.G., X-inactivation analysis in the 1990s: promise and potential problems, *Leukemia* 1998;12:128-135.
- Hodges E., Howell WM., Boyd Y., Smith JL., Variable X-chromosome DNA methylation patterns detected with probe M27 β in a series of lymphoid and myeloid malignancies. *Br. J. Haematol.* 1991; 77:315-22.
- Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., et al. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* 1987; 47:4801-4813.
- Hopwood J.J., Bunge S., Morris C.P., et al. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *HUM Mutat.* 1993; 2: 435-442.
- Luhovy M., Liu Y., Belikova M., et al. A novel clonality assay based on transcriptional polymorphism of X chromosome gene P55. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1995;1:81-87.