



دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه ی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی
پزشکی

بررسی میزان متیلاسیون ژن SOCS1 و اندازه گیری بیان این
ژن در بیماران مبتلا به سندرم بهجت

نگارش:

علی عبدی

اساتید راهنما:

دکتر زهره بابالو

دکتر ابراهیم سخی نیا

محل اجرا:

مرکز تحقیقات بیماریهای بافت همبند

اردیبهشت 1397

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه ی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی
پزشکی

بررسی میزان متیلاسیون ژن SOCS1 و اندازه گیری بیان این ژن
در بیماران مبتلا به سندرم بهجت

نگارش:

علی عبدی

اساتید راهنما:

دکتر زهره بابالو

دکتر ابراهیم سخی نیا

استاد مشاور:

دکتر علیرضا خبازی

محل اجرا:

مرکز تحقیقات بیماریهای بافت همبند

اردیبهشت 1397

شماره پایان نامه:

57363

گواهی اصالت پایان نامه

بدین وسیله گواهی می شود که این پایان نامه براساس نتایج بررسی ها و تحقیقات انجام گرفته توسط اینجانب تهیه و تنظیم گردیده است و به عنوان پایان نامه در سایر مقاطع و دوره های تحصیلی گذشته رایحه نگردیده است.

بدین وسیله اصالت (ORIGINALITY) و صحت نتایج این پایان نامه مورد تایید اینجانب، دکتر زهره بابالو (استاد راهنما و مجری طرح) می باشد.

تقدیر و تشکر:

سپاس وتشکر از زحمات و حمایت های بی دریغ
اساتید گرامی :

**سرکار خانم دکتر زهره بابالو و جناب آقای
دکتر ابراهیم سخی نیا**

با سپاس از مشاوره و حمایت های استاد
مشاور:

جناب آقای دکتر علیرضا خبازی

و با تشکر از تمامی اساتید بزرگوار،
دوستان و همکاران گرامی در مرکز تحقیقات
و آزمایشگاه تخصصی ایمنولوژی که در انجام
این پایان نامه همکاری صمیمانه داشتند.



Title: Evaluation of SOCS1 Methylation in patients with mBehcet's disease

Authors: Ali abdi, Alireza Khabazi, Ebrahim Sakhinia, Shahriar Alipour, Mahsa Talei, Zohreh Babaloo

PII: S0165-2478(18)30167-6

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.07.001>



اختصارات:

AP-1: Activator protein 1

BD: Behçet's disease

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DNMTs: DNA methyltransferases enzymes

HATs: Histone acetyltransferases

HLA: Human Leukocyte Antigen

LPS: Lipopolysaccharide

Me5C: 5-methyl cytosine

MEFV: Mediterranean fever

MHC: Major histocompatibility complex

MSP: Methylation Specific PCR

MS: Multiple sclerosis

NFKB: Nuclear factor-kappa B

NFAT2: Nuclear factor of activated T cells 2

NLRs: Nod-like receptors

RA: Rheumatoid arthritis

RLRs: RIG-I-like receptors

IL-10: Interleukin-10

PSS: Primary Sjögren's syndrome

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PCR: Polymerase Chain Reaction

SLE: Systemic Lupus Erythematosus

SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1

TH1: T-helper 1

TKRs: Toll like receptors

TNF: Tumor Necrosis Factor

T1D: Diabetes type one



چکیده :

مقدمه: اپیژنتیک به تغییرات ارثی میتوزی و میوزی در الگوی بیان ژنها اشاره می‌کند که مستقل از توالی اولیه DNA می‌باشد. از آنجاکه هایپرمتیلاسیون مربوط به SOCS1 می‌تواند منجر به فعال شدن مسیر سیگنالینگ JAK/STAT گردد و فعال‌سازی این مسیر می‌تواند بطور مستقیم موجب اثرگذاری سایتوکاین‌های مختلف بر روی عملکرد سلولها شده و به دنبال آن منجر به پاتوفیزیولوژی بیماری‌ها مخصوصا بیماری‌های اتوایمیون گردد که بطور مستقیم با میزان سایتوکاین‌ها درگیر در ارتباط هستند، و همچنین هنوز علت و پاتولوژی بیماری بهجت بطور کامل مشخص نشده است بنابراین هدف از این مطالعه تعیین الگوی متیلاسیون ژن SOCS1 در افراد مبتلا به بیماری بهجت و مقایسه آن با افراد گروه کنترل می‌باشد.

روش کار: این مطالعه یک مطالعه مورد-شاهدی بوده که 50 نفر بیمار مبتلا به بهجت و 60 نفر گروه کنترل در این مطالعه شرکت داشتند. از تمامی افراد مورد مطالعه نمونه خونی تهیه شد. سپس سلول‌های تکهسته‌ای (PBMCs) توسط روش فایکول (Ficoll) جدا شده و پس از استخراج DNA با روش Salting out و بررسی آن با نانودراپ، متیلاسیون جایگاه‌های مورد نظر توسط تکنیک qMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: یافته‌های مربوط به میزان متیلاسیون و بیان ژن نشان می‌دهد که میزان متیلاسیون در گروه بیمار نسبت به افراد گروه سالم افزایش نشان داده که این افزایش معنی‌دار آماری بوده است ($P\text{-value} < 0.05$). همچنین نتایج مربوط به بیان ژن مشخص کرد که میانگین بیان ژن در گروه بیمار نسبت به گروه سالم کاهش داشته که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P\text{-value} < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از این بیماری می‌توان حدس زد که شاید متیلاسیون DNA در شرایط خاصی از بیماری دخالت داشته باشد و منجر به تنظیم بیان ژن‌های دخیل در روند پاتوژنز بیماری گردد.

کلید واژه: متیلاسیون DNA، بیماری بهجت، ژن *SOCS1*، *qMS-PCR*

فصل اول:

مقدمه و بیان مسئله



بیماری بهجت با آفت‌های دهانی عود کننده، یووتیس، زخم‌های دهانی و آسیب‌های پوستی مشخص می‌شود. از آنجا که تنها هرات‌عروقی در این بیماری شایع است، آنرا به عنوان اسکولیت نیز در نظر می‌گیرند. با این حال، علایم پاتولوژیک بافتی غالب در بافت‌های ملتهب شامل اینفیلتراسیون لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و در بعضی موارد لکوسیت‌های چندهسته‌ای می‌باشد. در این بیماری ترومبوفیلیا یا لخته شدگی در عروق کوچک و بزرگ معمول می‌باشد، در حالیکه آرتریت در این بیماری نادر است. این بیماری شیوع بیشتری در کشورهای در محدوده جاده ابریشم از ژاپن تا مناطق مدیترانه ای دارد، لذا ما را بر آن داشت تا این بیماری را در اولویت مطالعات خود قرار دهیم (1).

فرایندهای متیلاسیون DNA بوسیله پروتئین‌هایی بنام DNA متیل‌ترانسفرازها (DNMTs) کاتالیز می‌شوند که از S-آدنوزیل متیونین (SAM) بعنوان دهنده متیل استفاده می‌کند و بطور اختصاصی اتم کربن شماره 5 در حلقه سیتوزین را متیله می‌کند. SAM در میان سلول توزیع گردیده و بعنوان دهنده متیل برای انواع متیل‌ترانسفرازها عمل می‌کند. اهداء گروه متیلی از SAM منجر به تولید S-آدنوزیل هموسیستئین (SAH) می‌گردد. داروهای مهارکننده DNA متیل‌ترانسفراز توانایی آنزیم‌های متیله‌کننده جزایر CpG را کاهش یا بلوکه می‌کند و اجازه می‌دهد ژنهایی که از قبل خاموش شده بودند، دوباره بیان گردند (2). امروزه اپیژنتیک بعنوان یک مکانیسم مهم در اتیولوژی بیشتر بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است.

سایتوکاین‌های مختلفی مانند اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها و فاکتورهای تحریک کننده کلنی به خانواده بزرگ گیرنده‌های سایتوکاینی نوع I/II روی غشا متصل می‌شوند و از طریق دمین‌های پروگزیمال غشایی JAK3 منجر به فسفریلاسیون آنها می‌شود (3). اینترفرون گاما، GM-CSF، IL-2، IL-6، IL-12، IL-15، IL-17، IL-21، IL-22 و IL-23 از طریق ترکیبات مختلفی از طریق JAK/STAT در سطح سلولی فعال می‌شوند و در پاتوژنز عفونت‌ها، بد خیمی‌ها و اختلالات خود ایمنی/التهابی مانند آرتریت روماتوئید، IBD و پسوریازیس نقش دارند (4). در مسیرهای پایین دست، STAT1 برای IL-6 و IL-2 و اینترفرون گاما مورد نیاز است درحالی‌که STAT3 با اینترلوکین‌های 2، 6، 12 و 23 در ارتباط می‌باشد. سایتوکاین ضد التهابی IL-10 توسط مسیر JAK1/STAT3 با سیستم تنظیمی SOCS3 فعال می‌گردد (3).

گروهی از خانواده پروتئینی مهارکننده سیگنالینگ سایتوکاین‌ها که نقش کلیدی در تنظیم منفی انتقال سیگنالینگ سایتوکاین‌ها بازی می‌کنند، خانواده پروتئینی SOCS ها هستند. این پروتئین‌ها در فیدبک منفی، بعنوان مهارکننده مسیر سیگنالینگ JAK/STAT ها عمل می‌کند و بعنوان فعال‌کننده این مسیر (JAK/STAT) از طریق تعدیل پاسخ‌های سلولی عمل می‌کند (5). SOCS1 معلوم شده است که مهارکننده فعالیت توموری داشته و بیان مجدد ژن SOCS1 باعث مهار رشد و القاء آپوپتوز سلولهای HCC می‌گردد (6). در میان هشت پروتئین مربوط به خانواده پروتئینی SOCS، SOCS1 قوی‌ترین و موثرترین این پروتئین-

هامی‌باشد. این پروتئین بطور مستقیم با پروتئین JAK ارتباط برقرار می‌کند و با اتصال به جایگاه تیروزین فسفریله روی دمین سیتوپلاسمی گیرنده سایتوکاین، مسیر سیگنالینگ را مهار میکند. این ژن روی کروموزوم 16 در موقعیت 16p13.1 قرار دارد (7). از آنجاکه هایپرمتیلاسیون مربوط به SOCS1 می‌تواند منجر به فعال شدن مسیر سیگنالینگ JAK/STAT گردد و فعال‌سازی این مسیر می‌تواند بطور مستقیم با اثرگذاری سایتوکاین‌های مختلف مانند IL-6 بر روی عملکرد سلولها می‌گردد که به دنبال آن منجر به پاتوفیزیولوژی بیماری‌ها مخصوصاً بیماری‌های اتوایمیون شود که علایم پاتوفیزیولوژیک بطور مستقیم با میزان سایتوکاین‌های درگیر ارتباط دارند (8).

علی‌رغم اینکه وجود سایتوکاین‌های پیش التهابی و مرتبط با سلول‌های Th1/Th17 در پاتوژنز بیماری بهجت به اثبات رسیده است، اما هنوز علت و پاتولوژی بیماری بهجت در مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی بطور کامل مشخص نشده است. با این حال، تحقیقات اخیر پیشرفتهای قابل توجهی را نشان می‌دهند. از آنجا که بیماری‌های روماتولوژیک از جمله بیماری‌هایی هستند که علاوه بر ژنتیک، با عوامل محیطی مانند نژاد نیز در ارتباط هستند، و همچنین بخاطر اینکه فرآیندهای اپیژنتیکی تحت تاثیر عوامل محیطی بر روی بیان ژنها موثر واقع می‌شوند، ما را بر آن داشت که مطالعه‌ای بر روی تاثیر متیلاسیون و بیان یکسری از ژنهای موثر در این بیماری در نژاد آذربایجانی انجام دهیم. این مطالعه در آزمایشگاه مرکزی دانشکده علوم نوین با همکاری بالینی مرکز

تحقیقات بیماری‌های بافت همبند انجام پذیرفت. با توجه به نقش اثبات شده ژن‌های JAK1 و STAT3 در بیماری‌های روماتولوژیک و بهجت و عدم مطالعه بر روی میزان متیلاسیون و بیان ژن‌های درگیر در این مسیر، ما را بر آن داشت تا میزان متیلاسیون و بیان ژن SOCS1 را بعنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی مسیر JAK/STAT در بیماران دارای سندرم بهجت مورد ارزیابی قرار دهیم، تا امکان دستیابی و شناسایی مکانیسم‌های ارتباطی احتمالی این ژن‌ها با بیماری بهجت فراهم گردد.

تعریف واژه های اختصاصی:

بیماری بهجت: از جمله بیماری‌های روماتولوژیک می‌باشد که با آفت‌های عود کننده دهانی، زخم‌های چشم، زخم‌های تناسلی، و ضایعات پوستی مشخص می‌گردد.

MS-PCR: این تکنیک جزء شایع ترین تکنیک‌های مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل متیلاسیون DNA می‌باشد. PCR خاص متیلاسیون (MS-PCR) متکی به آمپلیفیکاسیون برای ارزیابی وضعیت متیلاسیون در جایگاه‌های CpG خاص می‌باشد.

SOCS: گروهی از خانواده پروتئینی مهارکننده سیگنالینگ سایتوکاین‌ها که نقش کلیدی در تنظیم منفی انتقال سیگنالینگ سایتوکاین‌ها بازی می‌کنند، خانواده پروتئینی SOCS ها هستند. این پروتئین‌ها در فیدبک منفی، بعنوان مهارکننده مسیر سیگنالینگ JAK/STAT عمل می‌کند

الف) هدف کلی طرح:

بررسی میزان متیلاسیون ژن SOCS1 با استفاده از تکنیک MS-PCR و اندازه‌گیری بیان نسبی این ژن در بیماران مبتلا به سندروم بهجت و مقایسه آن با افراد گروه سالم

ب) اهداف اختصاصی طرح:

هدف اختصاصی اول: تعیین میزان متیلاسیون ژن SOCS1 در بیماران بهجت و مقایسه آنها با افراد سالم با استفاده از تکنیک MS-PCR

هدف اختصاصی دوم: تعیین میزان بیان ژن SOCS1 در بیماران بهجت و مقایسه آنها با افراد سالم با استفاده از تکنیک Real-time PCR

هدف اختصاصی سوم: تعیین ارتباط متیلاسیون جایگاه پروموتوری ژن SOCS1 و میزان بیان این ژن در بیماران بهجتی و افراد گروه کنترل و مقایسه آنها.

فرضیات طرح :

فرضیه اول: میزان متیلاسیون جایگاه پروموتوری ژن SOCS1 در بیماران بهجتی نسبت به افراد سالم تغییر می‌یابد.

فرضیه دوم: بیان نسبی ژن SOCS1 در بیماران بهجتی نسبت به افراد سالم تغییر خواهد یافت.

فرضیه سوم: بین میزان متیلاسیون مربوط به ژن SOCS1 و بیان این ژن، ارتباط معنی‌داری وجود خواهد داشت.

فصل دوم : بررسی متون



بیماری بهجت با آفت‌های دهانی عود کننده، یووتیس زخم‌های دهانی و آسیب‌های پوستی مشخص می‌شود. از آنجا که تظاهرات عروقی در این بیماری شایع است، آن را به عنوان واسکولیت در نظر می‌گیرند. با این حال، علایم پاتولوژیک بافتی غالب در بافت‌های ملتهب شامل اینفیلتراسیون لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و در بعضی موارد لکوسیت‌های چندهسته‌ای می‌شود. ترومبوفیلیا یا لخته‌شدگی در عروق کوچک و بزرگ معمول می‌باشد، در حالیکه آرتریت در این بیماری نادر است. در این میان، بیماری بهجت در مقایسه با سایر واسکولیت‌ها خاص می‌باشد (1).

اپیدمیولوژی:

این بیماری شیوع بیشتری در کشورهای محدوده جاده ابریشم که بعنوان جاده قدیمی و باستانی میان مدیترانه و آسیای شرقی معروف است، بعنوان جایگاه اصلی گسترش بیماری شناخته شده است (9). ترکیه کشوری که بیشترین میزان بروز بیماری را داراست و شیوعی در حدود 110 تا 420 به ازای هر 100,000 نفر برآورد شده است (10). در حالیکه ژاپن شیوعی در حدود 13-20 نفر به ازای هر صد هزار نفر دارا می‌باشد و شیوع این بیماری در کشورهای مثل انگلستان و ایالات متحده در حدود 1-2 نفر به ازای هر صد هزار نفر می‌باشد (11). شیوع این بیماری هنوز در میان سرخ‌پوستان ناشناخته می‌باشد و فقط بصورت هر چند وقت یکبار در میان افرادی با اصالت آفریقایی گزارش می‌شود (12).

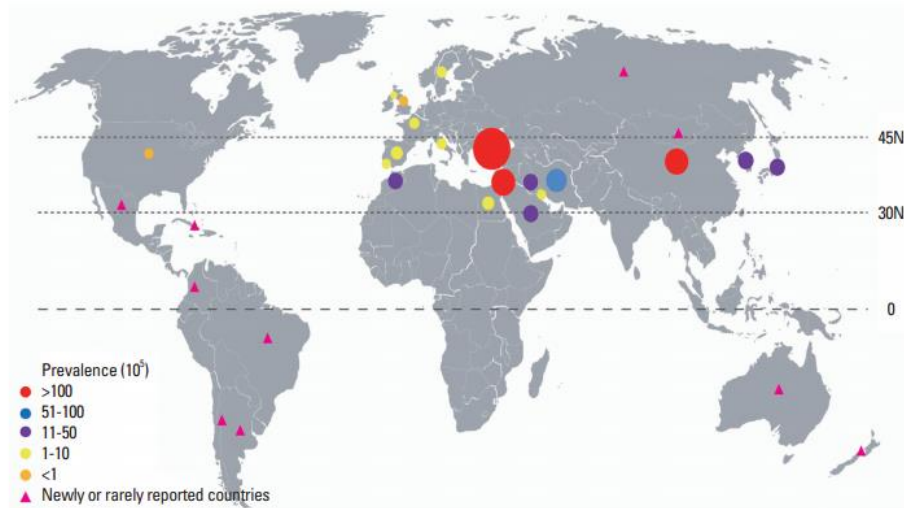


Fig. 1. Global distribution of Behçet's disease. Dot size reflects prevalence.

شکل 1-2 شیوع بیماری بهجت و پراکنش آن در کشورهای مختلف دنیا.

بیماری بهجت معمولاً در بزرگسالان مشاهده می‌شود و در میان کودکان بسیار نادر می‌باشد. در جمعیت مدیترانه خاور، این بیماری بیشتر در میان مردها رایج است (13). در جمعیت آسیایی، نسبت جنسی برعکس می‌باشد یعنی اینکه بیماری در میان زنان رایج‌تر است (14). در میان قفقازی-ها و سفیدپوستان این بیماری ارتباط فAMILی غیر معمول می‌باشد اما در میان بیماران غیر سفیدپوست در حدود 12 درصد رابطه خانوادگی مثبت می‌باشد (15). و رابطه هم-نژادی در مطالعات ترکیه در حدود 11.4 تا 52.5 گزارش شده است. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که یک جزء ژنتیکی همانند بیماری‌های ژنتیکی پیچیده‌ای همانند بیماری التهاب روده، وجود دارد.

جدول 1-2 شیوع بیماری بهجت در کشورهای مختلف.

Table 1. Countries with High Prevalence of Behçet's Disease

Country	Prevalence per 10 ⁵ population
Turkey [Istanbul (urban)] ²⁰	420
Israel (Druze) ²⁰	146.4
Northern China ²⁰	110
Iran ¹⁵	80
Korea ¹⁶	30.2
Japan (Hokkaido) ²⁰	22
Saudi Arabia ²⁰	20
Iraq ²⁰	17
Morocco ¹⁴	>15
Egypt ²⁰	7.6

استعداد ژنتیکی و اتیوپاتولوژی:

هنوز اتیوپاتولوژی دقیق بیماری بهجت روشن نشده است. با این حال، بیشتر مطالعات نشان می‌دهند که این بیماری توسط فاکتورهای محیطی، مانند عوامل عفونت‌زا یا آلودگی، در بیماران با سابقه استعداد ژنتیکی ایجاد می‌شود (16).

تعدادی از مطالعات، رابطه قوی میان HLA-B51 با بیماری در نژادهای مختلف نشان داده است (17). گروه Mizuki اخیراً نشان داده اند که مناطق بحرانی برای بیماری بهجت در انسان در مناطق MHC در محدوده 46 کیلوبازی میان MHC کلاس I وابسته به ژن A (MIC-A) و ژن HLA-B نشان‌گذاری شده است (18). MIC-A یک عضو بسیار پلی‌مورفیک از MHC کلاس I با بیش از بیست آلل برحسب تنوع آمینواسیدی در دومن‌های آلفا یک ($\alpha 1$)، آلفا دو

($\alpha 2$) ، آلفا سه ($\alpha 3$) می‌باشد. MIC-A (19) یک گلیکوپروتئین سطحی را بیان می‌کند که با میکروگلوبولین دو در ارتباط نمی‌باشد و فاقد جایگاه CD8 بوده، که ساختار پایدار مستقل از لیگاندهای پپتیدی نوع I معمول، می‌باشد (19). MIC-A در سلول‌های متنوعی بیان می‌شود و بیان آن بوسیله پروموتور اجزا شوک حرارتی شبیه با ژنهای hsp70 تنظیم می‌شود. (19) طبقه بندی و آنالیز پیوستگی میان MIC-A009 و HLA-B51 مشخص کرده است که ژنهای مستعد بیماری بهجت خود آللهای HLA-B51 می باشند (19).

همچنین مطالعات متاآنالیز این بیماری نشان داده است که واریته‌های معمول IL10 و ژنهای رمز کننده گیرنده اینترلوکین 23 (IL-23R) و گیرنده بتای اینترلوکین 12 (IL-12 β) قویاً با بیماری بهجت در ارتباط است (20).

IL-23 ، سایتوکاین پیش التهابی است که منجر به تحریک تکثیر سلول‌های Th17 ، افزایش تولید سایتوکاین‌های التهابی و افزایش بیان mRNA ی IL-23, p19 در زخم‌های پوستی شبیه به اریتماندوزا در بیمارانی با بهجت فعال می‌شود (21).

IL-10 بعنوان سایتوکاین ضد التهاب شناخته شده است که عملکرد سایتوکاین‌های التهابی را مهار کرده و منجر به تنظیم افزایشی سلول‌های T تنظیمی (Treg) از نوع CD4⁺ CD25⁺ در بیماری بهجت می‌گردد (22). بنابراین IL-10 و ژنهای IL23R و IL12R ممکن است نقش‌های اصلی در پاتوژنز بیماری بهجت را بازی کنند.

عوامل عفونی مخصوصاً ویروس هرپس سیمپلکس (HSV) و استرپتوکوکوس سانجیوس (S.sanguis) بعنوان راه اندازهای محیطی برای بیماری بهجت به اثبات رسیده اند. مبتلایان به بیماری بهجت مقادیر بالایی از S. sanguis در فلور دهانی خودشان نسبت به افراد سالم کنترل یا بیماران سایر بیماریها نشان می دهند. همچنین بیماران بهجتي واکنشهای ازدیاد حساسیت تاخیری را نشان می دهند و علاوه بر این زخمهای دهانی در مقابل آنتی ژنهای استرپتوکوکی پس از تزریق پوستی یا آزمون خراش توسط آنتی ژنهای استرپتوکوکی نشان می دهند (23).

اگرچه اتیولوژی این بیماری هنوز ناشناخته مانده است اما اعتقاد بر این است که بیماری بهجت با فاکتورهای محیطی مثل عوامل میکروبی در افراد دارای زمینه ژنتیکی خاص شروع می شود، این بیماری شیوع بیشتری در کشورهای محدوده جاده ابریشم از ژاپن تا مناطق مدیترانه ای دارد. واکنش متقابل بین ژنتیک و فاکتورهای محیطی ممکن است، اساس بیماری زایی در افراد مبتلا به این بیماری باشد. تحقیقات اخیر نشان داده است که علاوه بر ژنتیک شواهدی قوی مبنی بر نقش اپی ژنتیک در پاتژنز بیماریهای خود ایمنی وجود دارد (24, 25).

در مطالعه ای که بر روی سلولهای لمفوسیت $T\gamma\delta$ انجام شد، در این سلولها مارکرهای فعال کننده این لمفوسیتها مانند CD25، CD69 و CD29 افزایش بیان نشان داده و منجر به افزایش تولید سایتوکاینهای التهابی $IFN-\gamma$ و TNF آلفا می گردد (1). بر این اساس، سلولهای وابسته به Th1 محیطی به طور قابل توجهی در بیماری فعال بهجت

افزایش می‌یابد. علاوه بر این، مشخص شد که سطوح سرمی IL-12 ممکن است با سلول‌های محیطی Th1 و پیشرفت بیماری ارتباط داشته باشد، هر چند مکانیسم افزایش تولید IL-12 در بیماری بهجت هنوز ناشناخته مانده است. اهمیت میزان IL-6 موجود در CSF، بعنوان یک مارکر فعالیت بیماری و یک پیامد دراز مدت در گروه‌های هتروژن بیماران بهجتي با علائم عصبی نشان داده شده است. همچنین میزان IL-6 در این بیماران با علائم مزمن پیشرونده بطور برجسته‌ای افزایش می‌یابد (26). مبتلایان به بهجت فعال، سطوح سرمی بالایی از IL-6، IL-17، IL-23 و سلول‌های Th17 را نشان می‌دهند (27). روش‌های درمانی همچون IFN- α و عوامل آنتی TNF- α که در بیماری بهجت با درگیری چشم موثر هستند، نشان داده‌اند که پاسخ‌های سلول‌های Th17 را مهار می‌کنند (28، 29).

پاسخ سلول‌های T از نوع Th1/Th17 در بیماری بهجت دچار تنظیم افزایشی می‌شوند. اگرچه، مسیر سیگنالینگ در این سلول‌ها با انحراف پاسخ‌های ایمنی رابطه دارند اما هنوز بطور کامل روشن نشده‌اند. هر دو نوع سلول T از نوع CD4⁺ و CD8⁺ در بافت‌های التهابی و خون محیطی بیماران بهجتي، تولید سایتوکاین‌های التهابی شامل IL-2، IL-12 و اینترفرون گاما را افزایش می‌دهند (30). سلول‌های Th-17 یک زیرمجموعه نسبتاً جدیدی از سلول‌های Th بوده که بطور عمده IL-17A، IL-17F، IL-22 و TNF- α را تولید می‌کنند (31). اطلاعات اخیر مشارکت IL-17 و پاسخ‌های سلول-

های Th17 را در پاتوژنز بیماری بهجت به اثبات رسانده است.

فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا ($\text{TNF } \alpha$) یک سایتوکاین چند عملکردی است که بعنوان یک سایتوکاین پیش‌التهابی، نقش بسیار مهمی در تنظیم سیستم ایمنی در شبکه سایتوکاینی بازی کند، که همین عملکرد، می‌تواند به نقش واکنش‌های التهابی راجعه در بیماری بهجت اشاره کند (32). این سایتوکاین در ناحیه کلاس III کمپلکس HLA همجوار با HLA-B به رمز در می‌آید و بیشتر مطالعات نشان داده‌اند که مقدار نسبی تولید این سایتوکاین ممکن است در تعیین آغاز بیماری، پیشرفت آن و پیامدهای پس از آن اهمیت داشته باشد (34). به خاطر همین، این سایتوکاین بعنوان یک ژن کاندید دخیل در پاتوژنز بیماری بهجت شناخته شده است.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که ویتامین D یک فاکتور مهم محیطی در بیماری‌های اتوایمیون ایجاد شده توسط سلول‌های T است، نشان داده شده است، که ویتامین D نقش مهمی بر روی سیستم ایمنی دارد، و جذب‌های مختلف سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (35).

ویتامین D در تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی شامل $\text{IFN-}\gamma$ ، IL-17، IL-21 و IL-12 از طریق مهار پروليفراسیون Th-1 و Th-17 و تحریک بیان سلول‌های Treg و IL-10، عمل می‌کند. همچنین کاهش تمایز سلول‌های B و مهار ترشح ایمونوگلوبین، محدود کردن ارائه آنتی‌ژن از طریق

ماکروفاژ و تعدیل بلوغ سلول‌های دندریتیک (DCs) مرتبط با ویتامین D است (35, 36).

شکل فعال ویتامین D (D(1,25- dihydroxyvitamin D3 دارای خصوصیت بسیار قوی تعدیل‌کننده ایمنی است که نقش بسیار فعال در پیشگیری و معالجه‌ی بیماری‌های عفونی و اتوایمیون دارد. انواعی از سلول‌های ایمنی شامل: ماکروفاژ، سلول‌های دندریتیک (DCs) و سلول‌های فعال Tگیرنده داخل سلولی ویتامین D (VDR) را بیان می‌کنند، مکانیسم عمل ویتامین D در تنظیم ایمنی آدابتیو معلوم نیست و ممکن است شامل اثر مستقیم و یا غیر مستقیم روی تمایز و عمل سلول‌های T باشد (35).

مطالعات انجام شده کاهش سطح ویتامین D در بیماری‌های اتوایمیون مثل دیابت ملیتوس نوع دو، لوپوس اریتروماتوز سیستمیک (SLE)، بیماری بهجت (BD)، مولتیپل اسکلروزیس (MS) و بیماری التهابی روده (IBD) را نشان می‌دهد و ممکن است ویتامین D یک عامل راه‌انداز (Trigger) برای بیماری بهجت باشد (35).

مسیر سیگنالینگ JAK/STAT و ژنهای SOCS:

سایتوکاین‌های مختلفی مانند اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها و فاکتورهای تحریک‌کننده کلنی به خانواده بزرگ گیرنده‌های سایتوکاینی نوع I/II روی غشا متصل می‌شوند و از طریق دمین‌های پروگزیمال غشایی JAK3 منجر به فسفریلاسیون آنها می‌شود (3). اینترفرون گاما، GM-CSF، IL-2، IL-6، IL-12، IL-15، IL-17، IL-21، IL-22 و IL-23 از

طریق ترکیبات مختلفی از JAK/STAT در سطح سلولی فعال می‌شوند و در پاتوژنز عفونت‌ها، بد خیمی‌ها و اختلالات خودایمنی/التهابی مانند آرتریت روماتوئید، سندرم روده تحریک‌پذیر (IBD) و پسوریازیس درگیر هستند (4). مسیرهای سیگنالینگ JAK/STAT برای فعال‌سازی سیستم ایمنی ذاتی بسیار اهمیت دارند. بطوریکه سیگنال مربوط به IFN- γ ، IL-2 و IL-6 از طریق JAK1 به همراه JAK2 و JAK3 فعال می‌شود در صورتیکه اینترلوکین‌های 12 و 23 از طریق مسیر JAK2/Tyk2 فعال می‌شوند (37). در مسیرهای پایین دست، STAT1 برای اینترلوکین‌های 2 و 6 و اینترفرون گاما مورد نیاز است در حالیکه STAT3 با اینترلوکین‌های 2، 6، 12 و 23 در ارتباط می‌باشد. سایتوکاین ضد التهابی IL-10 توسط مسیر JAK1/STAT3 با سیستم تنظیمی SOCS3 فعال می‌گردد (3). همچنین STAT3 در ایجاد تعادل میان سلول‌های Th17 و Treg و تحریک تکثیر سلول‌های TCD4+ بسیار اهمیت دارد. STAT3 با بسیاری از ژنها در ارتباط می‌باشد مخصوصاً با IL-6 که در تمایز سلولی Th17، فعال‌سازی سلولی، تکثیر و بقاء، تنظیم مدیفاکسیون اپیژنتیک و بیان درگیر می‌باشد. بنابراین، STAT3 جنبه‌های بسیار مهم و حیاتی عملکرد سلول‌های T در التهاب و هموستازی را سامان‌دهی می‌کند (38). نشان داده شده که سایتوکاین‌های مرتبط با مسیر JAK/STAT و رده‌های سلولی Th در بیماری بهجت فعال می‌شوند. مشاهده شده است که اینترلوکین 12 فعال شده و اینترفرون گاما ترشح شده از سلول‌های Th1 و اینترلوکین 23 فعال شده در رده

سلولی Th17، در خون محیطی و بافت‌های بیماران بهجت افزایش یافته‌اند (39).

گروهی از ژن‌های القاء کننده و مهارکننده سیگنالینگ که نقش کلیدی در مسیر فرآیند مرگ فیزیولوژیک سلولی (آپوپتوزیس) بازی می‌کنند، ژن‌های BCL2 و BAX هستند. این پروتئین‌ها در فیدبک منفی، بعنوان مهارکننده مسیر سیگنالینگ JAK/STAT عمل می‌کند و بعنوان فعال‌کننده این مسیر (JAK/STAT) به منظور تعدیل در پاسخ‌های سلولی عمل می‌کنند (5). نسبت عوامل القاء کننده و مهارکننده و توازن بین آن‌ها تعیین کننده‌ی مسیر آپوپتوز یا بقای سلول زنده است. در میان ژن‌های درگیر در فرآیند آپوپتوز ژن‌های اعضای خانواده BCL-2 نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز دارند. BCL-2 یک ژن آنتی آپوپتوزی می‌باشد که بقای سلول را پیش می‌برد در حالیکه BAX یک ژن پروآپوپتوزی می‌باشد که منجر به پیش‌برد مرگ فیزیولوژیک سلولی می‌گردد. در صورت کاهش میزان بیان ژن مربوط به پروتئین Bcl-2، فرایند مرگ برنامه ریزی شده سلول یا آپوپتوزی بواسطه فعال شدن سایر اونکوژن‌ها از قبیل p53، شروع می‌شود. با در نظر گرفتن نقش کاسپازها در سلول‌های مختلف، مطالعات نشان داده‌اند که Bcl-2 بواسطه مهار سنتز و تولید کاسپازها نیز می‌تواند فرایند آپوپتوز را مهار نماید. به طور اختصاصی‌تر پروتئین‌های Bcl-2 موجود در دیواره میتوکندری‌ها بواسطه‌ی جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C و یا با اتصال به Apaf-1 مانع از تشکیل آپوپتوزوم و به راه افتادن آبشار کاسپازی می‌شود (5).

متیلاسیون DNA و بیماری‌های انسانی:

امروزه اپیژنتیک بعنوان یک مکانیسم مهم در اتیولوژی بیشتر بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته شده است. طی دهه‌های گذشته، مطالعات اپیژنتیکی بیشتر روی تکوین جنین، پیری، و سرطان فوکوس شده است. اما اخیراً، اپیژنتیک در خیلی از زمینه‌های دیگر همچون التهاب، بیماری‌های ایمنی، چاقی، مقاومت انسولین، تیپ دو دیابت ملیتوس، بیماری‌های قلبی، و بیماری‌های نورودژنراتیو تمرکز کرده است. اینها ناشی از تغییرات اپیژنتیکی بوسیله فاکتورهای داخلی و خارجی و توانایی آنها در تغییر بیان ژن می‌باشد. سلول‌های یک ارگانیسم می‌توانند به توده‌های ناهمسان انواع سلول‌ها تمایز یابند ولو اینکه دارای توالی یکسان DNA در سلول باشند. این فرایندهای تمایز در همان اوایل تکوین معین می‌شوند که هر کدام از انواع سلول‌های بدست آمده یک پروفایل اپیژنتیکی منحصر به فردی در طی فرایندهای تمایز سلول‌های **Pluripotent progenitor** به سلول‌ها و بافتهای تمایز یافته کامل بدست می‌آورند (40). پروفایل اپیژنتیکی ممکن است بهم بخورد در صورتیکه سلول‌ها در معرض فاکتورهای محیطی مختلفی قرار گیرند (41). در یوکاریوتها، جزایر CpG متیله در مناطق **non-coding** (غیر رمزگذار) ژنوم پیدا شده‌اند که بطور قوی دلالت بر افزایش عملکردهای سلولی در ارتباط با مهار رونویسی دارند. اینها شامل خاموشی توالی‌های تکراری، غیرفعال‌سازی کروموزوم (X، genomic)

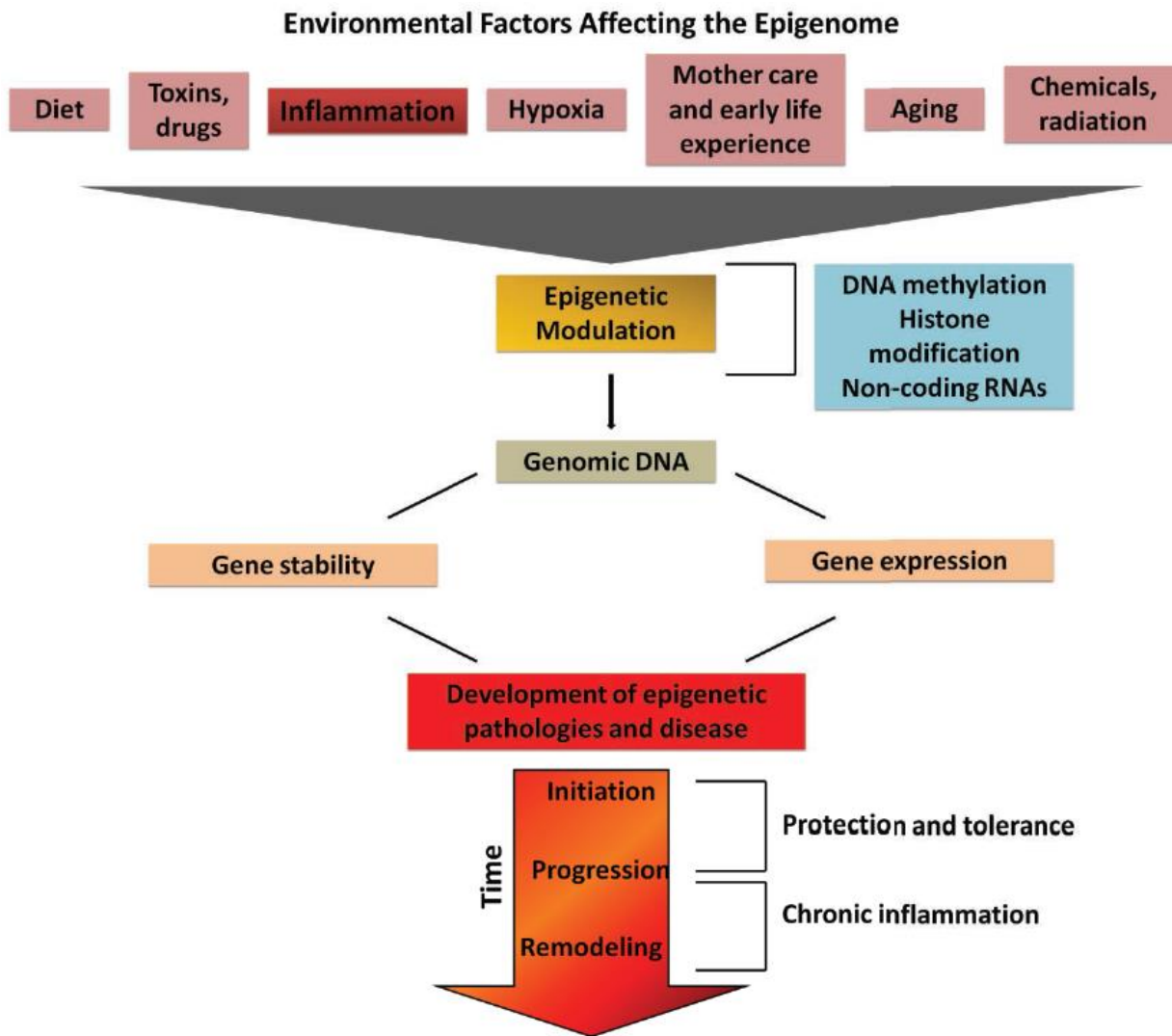
(imprinting ژنوم ایمپرینتینگ، تکوین جنینی پستانداران و گونه‌زایی نسل‌ها می‌گردد (42).

متیلاسیون غیرنرمال جزایر CpG در ارتباط با پروموتور، می‌توانند به از دست رفتن بیان ژن منجر گردند، که بعنوان یک مکانیسم جایگزین غیرفعال‌سازی ژن در موتاسیون‌های کاهش عملکردی است. مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک در سال‌های اخیر بسیار زیاد مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند و نتایج ازهم گسیخته آنها در بیماری‌های انسان شامل نقص‌های ایمنی، ناپایداری سانترومری و سندرم آنومالی صورت، سندرم X شکننده دیده می‌شوند (43). به ویژه، اختلال در تنظیم متیلاسیون DNA در سرطان بعنوان یک اتفاق ناگهانی و پرشتاب در گسترش تومورها بوسیله ژن‌های مهارکننده تارگت‌ها و مولکول‌های مربوط به تمایز مورد توجه قرار گرفته شده است (44). گزارشات پیشین نشان داده‌اند که ژنوم انواع تومورها توسط هیپومتیلاسیون (کاهش سرتاسری متیلاسیون) و هایپرمتیلاسیون نابجه‌جا (افزایش سرتاسری میزان متیلاسیون) جزایر CpG، بخصوص آنهاییکه به ژن‌های مهارکننده تومور مربوط می‌شوند، طبقه‌بندی می‌شوند (45). علاوه بر این، اپی‌ژنتیک انتخابی خاموش‌کننده انکوژن‌ها، با اشکال پاتولوژیک مهاجم و رفتار تومورها در ارتباط است. سایتوکاین‌ها و مسیرهای سیگنال ترانسداکشن (انتقال) بطور ذاتی با نواحی درگیر در رشد سرطان، تمایز، بلوغ و فعال‌سازی سلول‌های درگیر در التهاب و ایمنی، در ارتباط هستند (46). تنظیم شبکه سایتوکاین‌های التهابی بوسیله مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی در مطالعات

زیادی به اثبات رسیده است. از سوی دیگر، مقدار متیلاسیون CpG در پیری، افزایش می‌یابد که پیشنهاد کننده گسترش بیماری‌های مزمن است که می‌تواند به پیشرفت خاموشی ژنهای اساسی نسبت داده شود (47).

لیزین متیلترانسفراز توسط دمتیله کردن لیزین اثرات متیلاسیون را خنثی می‌کند (48). بنابراین فهم مکانیسم‌های اپیژنتیکی که چگونه بیان ژن را در فرایندهای التهابی تنظیم می‌کنند، بینش ما را در گسترش طراحی استراتژی به منظور بلوکه کردن یا کاهش پاسخ‌های التهابی وسعت می‌بخشد. این بخش روی درک التهاب در یافته‌های اخیر در تنظیم اپیژنتیکی بیان ژن بوسیله متیلاسیون عوامل اصلی فوکوس می‌کند (47).

شکل 1: اپیژنتیک و محیط. علائم اپیژنتیک، دینامیک هستند و در پاسخ به محرک‌های محیطی متنوع تغییر می‌کنند. این شماتیک نشان می‌دهد که چگونه محرک‌های مختلف و مکانیسم‌های اپیژنتیکی می‌توانند به پاتولوژی اپی-ژنتیکی تبدیل شوند. فاکتورهای محیطی روی فرایندهای مولکولی و سلولی پایین دست بوسیله مکانیسم‌های اپی-ژنتیکی شامل تغییرات رونویسی از طریق متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی و همچنین تغییرات در سطح ترجمه توسط مهار بواسطه non-coding RNAs، اتفاق می‌افتد (در التهابات ویژه)



شکل 2-2 اپیژنتیک و فاکتورهای دخیل در آن. این شماتیک نشان می‌دهد که چگونه محرک‌های مختلف و مکانیسم‌های اپیژنتیکی می‌توانند به پاتولوژی اپیژنتیکی تبدیل شوند.

اپیژنتیک در بیماری بهجت:

متیلاسیون DNA، معمولترین روش اپیژنتیکی، انتقال کووالانسی گروه متیل از S-آدنوزیل-L-متیونین به سیتوزینها است که منجر به خاموشی پایدار رونویسی می‌گردد. در پستانداران، متیلاسیون DNA، تقریباً محدود است به کلاسترهای C-فسفات-G دی نوکلئوتیدی که بنام جزایر CpG معروف هستند و بیشتر در مناطق پروموتور مشاهده می‌گردند. اگرچه مشاهدات اخیر بوسیله Irizarry و همکارانش نشان دادند که بیشتر متیلاسیون DNA خاص بافت در مناطقی دورتر از 2 کیلوبازی از پروموتور دیده می‌شوند. بطور کلی، جزایر CpG غیرمتیله در پروموتور اجازه شروع رونویسی را می‌دهند، درحالیکه جزایر CpG متیله در پروموتور فعالیت پروموتور را مهار می‌کنند. تقریباً 60 تا 90 درصد دی نوکلئوتیدهای CpG در سلولهای سوماتیک سالم متیله هستند (49).

فرایندهای متیلاسیون DNA بوسیله پروتئین‌هایی بنام DNA متیل ترانسفرازها (DNMTs) کاتالیز می‌شوند که از S-آدنوزیل متیونین (SAM) بعنوان دهنده متیل استفاده می‌کند و بطور اختصاصی اتم کربن شماره 5 در حلقه سیتوزین را متیله می‌کند. SAM در میان سلول توزیع گردیده و بعنوان دهنده برای انواع متیل ترانسفرازها عمل می‌کند. اهداء گروه متیلی از SAM منجر به تولید S-آدنوزیل هموسیستئین (SAH) می‌گردد. کاربرد داروهای مهارکننده DNA متیل ترانسفراز توانایی آنزیم‌های متیله‌کننده جزایر CpG را کاهش یا بلوکه می‌کند و اجازه می‌دهد

ژن‌هایی که از قبل خاموش شده بودند، دوباره بیان کردند. متیلاسیون DNA یک تغییر اپی‌ژنتیکی پایدار فوق-العاده می‌باشد. دو مکانیسم بنیادی پذیرفته شده که از طریق آن متیلاسیون DNA باعث خاموشی ژن‌ها می‌گردد، وجود دارد. اول، متیلاسیون DNA خودش می‌تواند افینیتی اتصال فاکتورهای رونویسی را کاهش می‌دهد. دوم اینکه، اتصال گروه‌های متیلی پروتئین‌های متصل شونده به جزایر CpG (MBPs) به مناطق پروموتوری را تقویت می‌کند که مشارکت آنها با کورپرسورهای کلاسیک منجر به فرایندهای رونویسی معیوب می‌گردد (49, 50).

بررسی متون:

در مطالعه دیگر توسط Yoshikawa و همکاران در سال 2001، به بررسی نقش تنظیم‌کنندگی منفی SOCS1 در مسیر JAK/STAT در بیماران با سرطان هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) پرداختند. مهار SOCS1 از طریق میزان متیلاسیون پروموتور آن می‌تواند مسیر سیگنالینگ مربوط به JAK/STAT را تحت تاثیر قرار دهد. در این تحقیق مشخص شد که متیلاسیون نابه‌جای جزایر CpG مربوط به ژن SOCS1 با خاموش کردن رونویسی در رده سلولی HCC در ارتباط می‌باشد. فراوانی متیلاسیون نابه‌جا در حدود 65% در نمونه‌های تومور اولیه HCC بود. مهار رشد ناشی از آپوپتوز است و توسط AG490 بعنوان یک مهارکننده شیمیایی خاص

JAK2 بازسازی می‌شود که فسفریلاسیون ساختاری STAT3 را در SOCS1 سلولهای غیرفعال تغییر می‌دهد. شیوع بالای متیلاسیون ناب‌جای SOCS1 و مهار رشد آن نشانگر اهمیت ساختار فعال مسیر JAK/STAT در رشد و توسعه HCC است. همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استراتژی‌های درمانی HCC شامل کاربرد SOCS1 در ژن‌درمانی و مهار JAK2 توسط مولکول‌های کوچکی مانند AG490 می‌باشد (6).

در یک مطالعه دیگر توسط Oliver Galm و همکاران در سال 2003 به بررسی نقش متیلاسیون SOCS1 بعنوان تنظیم کننده منفی در میلوما پرداختند. با توجه به نتایج مشاهده شده قبلی راجع به غیرفعال‌سازی مرتبط با هایپرمتیلاسیون SOCS1 در هپاتوسلولار کارسینوما و نقش حیاتی اینترلوکین-6 بعنوان یک فاکتور بقاء در مولتیپل میلوما، در این مطالعه میزان متیلاسیون پروموتور SOCS1 را در رده‌های سلولی مولتیپل میلوما (MM) مورد بررسی قرار داده شد. متیلاسیون ناب‌جای SOCS1 در رده‌های سلولی MM وابسته به اینترلوکین-6 (U266) دیده شد که با خاموش شدن رونویسی در ارتباط بودند. همچنین تریس کردن این رده‌های سلولی با فاکتورهای دمتیله‌کننده مانند 5-آزا-2-داکسیسیتیدین، میزان بیان SOCS1 را بصورت افزایشی تنظیم می‌کند. در این مطالعه توسط تکنیک MSP مشخص گردید که در 63 درصد از نمونه‌های بیماران MM متیلاسیون SOCS1 بصورت هایپرمتیله می‌باشد. به طور برعکس، آنالیز متیلاسیون در نمونه‌های لمفومای بدخیم مشخص کرد که فقط 2.3 درصد از آنها بصورت هایپرمتیله

بودند و هیچگونه متیلاسیون در نمونه‌های سلولی مغز استخوان و یا لکوسیت‌ها دیده نشد. نتایج حاصل از این مطالعه مشخص کرد که خاموشی ژن SOCS1 ممکن است حاصل هایپرمتیلاسیون آن در بیماران مبتلا به MM باشد. همچنین مشخص شد که خاموشی ژن SOCS1 ممکن است تنظیم منفی مسیر JAK/STAT را مختل کند بنابراین پاسخگویی به سایتوکاین‌ها افزایش یافته و بدینسان از بقاء و گسترش سلول‌های MM پشتیبانی می‌کند (51).

در یک مطالعه دیگر توسط Hatirnaz و همکاران در سال 2007 به بررسی نقش متیلاسیون ژن SOCS1 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید مزمن (CML) پرداختند. این تحقیق روی 56 بیمار مبتلا به CML و 16 نفر کنترل برای بررسی میزان متیلاسیون پروموتور ژن SOCS1 و جایگاه اگزون شماره 2 انجام گرفت. نتایج مشخص کرد که در اگزون شماره 2 در حدود 58.9 درصد بیماران و 93.8 درصد افراد گروه کنترل بصورت متیله بودند. در ناحیه پروموتور این ژن مشخص گردید که تمامی موارد هم در بیماران و هم در افراد کنترل بصورت دمتیله بودند. اگر چه مطالعات قبلی نشان داده بود که بین هایپرمتیلاسیون ناحیه اگزون 2 ژن SOCS1 و پیشرفت بیماری CML رابطه وجود دارد اما نتایج این مطالعه مشخص کرد که اینچنین ارتباطی دیده نمی‌شود. برعکس نتایج مشخص کرد که در بیماران CML بصورت هایپومتیلاسیون دیده می‌شود که این فرضیه نیاز به مطالعات بسیار گسترده دارد (52).

در یک مطالعه دیگر Oshimo و همکاران در سال 2004 به نقش اپیژنتیک و هایپرمتیلاسیون توالی‌های CpG در تنظیم SOCS1 در بیماران کارسینومای معده پرداختند. با توجه به اینکه در بیشتر مطالعات قبلی مشخص شده بود که متیلاسیون SOCS1 بیان این ژن را غیرفعال می‌کند. در این تحقیق به وضعیت متیلاسیون ژن SOCS1 در 75 بافت بیمار مبتلا به کارسینومای معده، 25 بافت موکوسی غیرسرطانی حاشیه تومور و 10 بافت موکوسی نرمال از افراد سالم توسط تکنیک MS-PCR پرداخته شد. در نهایت سطوح mRNA آنها توسط تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. هایپرمتیلاسیون ژن SOCS1 از 44% بافت سرطانی و فقط 12% از 25 نمونه حاشیه تومور مشخص گردید که نسبت به همدیگر اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P=0.004$). هیچکدام از بافت‌های مربوط به نمونه‌های افراد نرمال (10 نفر) هایپرمتیلاسیون را نشان ندادند. متیلاسیون ژن SOCS1 با متاستاز گره لنفاوی، با مرحله پیشرفت تومور، و با کاهش بیان SOCS1 در بافت‌های سرطانی ارتباط معنی‌داری داشتند. کاهش بیان SOCS1 در بافت‌های سرطانی با متاستاز گره‌های لنفاوی و مرحله پیشرفته تومور ارتباط داشتند. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که غیرفعال‌سازی رونویسی ژن SOCS1 توسط مکانیسم هایپرمتیلاسیون در پیشرفت، متاستاز سرطان معده در ارتباط است (53).

فصل سوم : مواد و روش کار



3-1- نوع مطالعه و زمان و مکان مطالعه:

این مطالعه از نوع مطالعات بالینی و بصورت مورد-شاهدی بوده است.

این مطالعه در آزمایشگاه مرکزی دانشکده علوم نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با همکاری مرکز تحقیقات بیماری‌های بافت همبند در سالهای 95-96 انجام پذیرفت.

3-2- جامعه نمونه آماری و روش نمونه گیری :

جهت تعیین تعداد نمونه با نظر مشاور آماری و با سطح اطمینان 95% و دقت 0/07 و سطح خطای نوع اول 0/05 ، تعداد نمونه ها ، 50 عدد از بیماران مبتلا به بیماری بهجت به عنوان گروه بیمار و 60 نفر از افراد سالم به عنوان گروه کنترل برآورد گردید.

در این بررسی جمعیت بیماران مبتلا به بیماری بهجت مورد مطالعه قرار گرفتند، این افراد بر اساس یافته های آزمایشگاهی و محتوای پرونده پزشکی با نظر پزشک متخصص ، بصورت تصادفی از میان مراجعه کنندگان به متخصص روماتولوژی ، که تحت درمان با سرکوب کننده های سیستم ایمنی نباشند انتخاب شدند. انتخاب بیماران بر اساس کرایتریاهای IBCD (The International Criteria for Behcet's Disease) صورت گرفت. همچنین میزان فعالیت بیماری بر اساس معیار های IBDDAM (Iran Behcet's Disease Dynamic Activity Measure) سنجیده شد که بر این اساس، درگیری های تهدید کننده ی عروق، چشم

و مفاصل ، نشان دهنده ی شدت بیماری است. گروه شاهد نیز شامل افراد نرمال است که فاقد هرگونه سابقه بیماری خودایمنی بوده و بصورت تصادفی از میان اهدا کنندگان مستمر خون ، آگاهانه انتخاب می شوند. دامنه سنی در هر گروه بین 20 تا 50 انتخاب شد.

پس از دریافت رضایت آگاهانه از داوطلبان از هر فرد 5 CC خون وریدی با ضد انعقاد EDTA جهت انجام تستهای ژنتیک دریافت شد. نمونه خون همراه EDTA تا زمان شروع کار در دمای 20- درجه نگهداری شدند. سپس با استفاده از روش Salting out (RGDE¹) به مقدار مورد نیاز DNA از نمونه های خونی استخراج گردید. پس از تعیین غلظت DNA ، طبق پروتکل مورد نظر کیت زایمو (Zymo) برای سنجش میزان متیلاسیون مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی میزان بیان ژن، از تمامی نمونه های مورد نظر، RNA طبق پروتکل کیت ترایزول جداسازی شدند. سپس توسط تکنیک Real-time PCR مورد آنالیز و سنجش قرار گرفتند.

درنهایت به منظور تایید مراحل انجام شده ، محصولات حاصل از PCR توسط روش ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند.

¹ Rapid Genomic DNA Extraction

3-3- دستگاه‌های مورد نیاز:

نام دستگاه	شرکت و کشور سازنده
Nanodrop 2000	Thermosience آمریکا
Geldoc	UVIDoc فرانسه
تانک ازت	
Power supply و تانک الکتروفورزیز	BioRad آمریکا
شیکر	
یخچال فریزر -20 و -70	
سانتریفیوژ ماکرو بدون یخچال	
سانتریفیوژ یخچال دار	
سمپلرهای متغیر (1 μ l و 10 μ l و 100 μ l و 1000 μ l)	eppendorph
هود level 2 مدل RS 120 JLBV	
اتوکلاو 25 لیتری شرکت کاوش ایران	
بن ماری	
دستگاه ترموسایکلر 96 پلت	
دستگاه تنظیم ولتاژ الکتروفورز	
نانودراپ	

جدول 3-1 مواد و تجهیزات مورد نیاز

3-4- مواد مورد نیاز:

اتانول 100% شرکت مرک آلمان

ایزوپروپانول شرکت مرک آلمان

کلروفرم

آب مقطر

DEPCE Water

محلول PBS

میکروتیوب 0.2 و 1.5 میلی لیتری شرکت

میکروتیوب 2.0 و 1.5 میلی لیتری RNase Free شرکت

دستکش‌های لاتکس از نوع لاتکس و وینیلی و نیتریلی

لوله‌های فالكون 15 و 50 میلی لیتری

سرسمپلر های 10، 100 و 1000 میکرو (کریستالی، زرد و آبی)

رک آبی، زرد مخصوص سرسمپلر های آبی و زرد و کریستالی

رک لوله فالكون 15 میلی لیتری

3-5- روش کار:

ابتدا تمام وسایل مورد نیاز شامل سرسمپلرها، دستکش، ماسک، محلول‌ها، ترايزول استريل شده و زیر هود قرار داده شد. سپس برای تمام مراحل کار میکروتیوب‌ها برچسب و شماره‌گذاری می‌شود. قبل از شروع استخراج بهتر است که

برخی از نمونه‌ها را شمارش سلولی انجام دهیم. بدین منظور 20µl از محلول سلول با 10µl رنگ تریپان بلو در یک میکروتیوب 2/. میلی لیتری مخلوط شده و در نهایت با استفاده از لام نئوبار سلول‌ها شمارش گردیدند. سپس سلول‌های جداسازی شده توسط فایکول، به منظور استخراج RNA و DNA مورد استفاده قرار گرفتند.

3-6- طرز تهیه محلول‌های مورد نیاز :

3-6-1- بافر فسفات سالین (PBS, Phosphate Buffered Saline) :

به منظور تهیه یک لیتر بافر فسفات سالین 1X، 8 گرم کلرید سدیم NaCl (137 میلی مولار)، 0.2 گرم کلریدپتاسیم 10 mM (KCL) را توزین کرده و به درون ارلن ریخته و این مخلوط را در 950 میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر دیونیزه حل نموده و PH را توسط NaOH و HCl غلیظ بر روی PH=7.4 تنظیم کرده و سپس حجم بافر را به یک لیتر رسانده و در حجم‌های 20 میلی‌لیتری تقسیم و اتوکلاو کرده و در نهایت در یخچال در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری می‌کنیم.

3-6-2- محلول اتانول 75% :

در یک فالكون 50 میلی‌لیتری، 37.5 میلی لیتر اتانول absolute (100%) شرکت مرک آلمان ریخته و حجم را با DEPC water به 50 می‌رسانیم و در نهایت در دمای 20- نگهداری می‌کنیم.

3-6-3- محلول‌های لازم جهت واکنش PCR:

الف) پرایمرها

غلظت پرایمرها مورد نیاز برای واکنش PCR، 1 میکروگرم در میکرولیتر می‌باشد که پس از تهیه این غلظت در آزمایشگاه دردمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

Table 1- PCR Primers AND Product size		Target size
QMS-PCR FOR SOCS1	FM-SOCS1: GTTCGTCGGTTTTATTTAGGTCGTTTTTC	165
	RM-SOCS1: CGATTCTAACTCCAACCGTCCG	
	FU-SOCS1: GGGTTTTTGTGTTGGTTTTATTTAGGTTGTTTTTT	173
	RU-SOCS1: CAACCAATTCTAACTCCAACCATCCA	

3-6-4- محلول‌های لازم جهت الکتروفورز کردن DNA :

الف) بافر الکتروفورز 5xTBE

برای تهیه بافر 5xTBE به این شکل عمل می‌شد: برای تهیه 1000 میلی لیتر از این محلول، 54 گرم از پودر Tris را با 27.5 گرم اسید بوریک مخلوط کرده و 20 میلی لیتر EDTA(0.5M) به آن اضافه می‌کنیم و با آب مقطر حجم محلول را به 1000 میلی لیتر می‌رسانیم. برای بافر داخل تانک الکتروفورز از بافر 1X TBE استفاده شد. همچنین از این بافر برای تهیه ژل آگارز نیز استفاده شد.

ب) بافر بارگذاری DNA در ژل

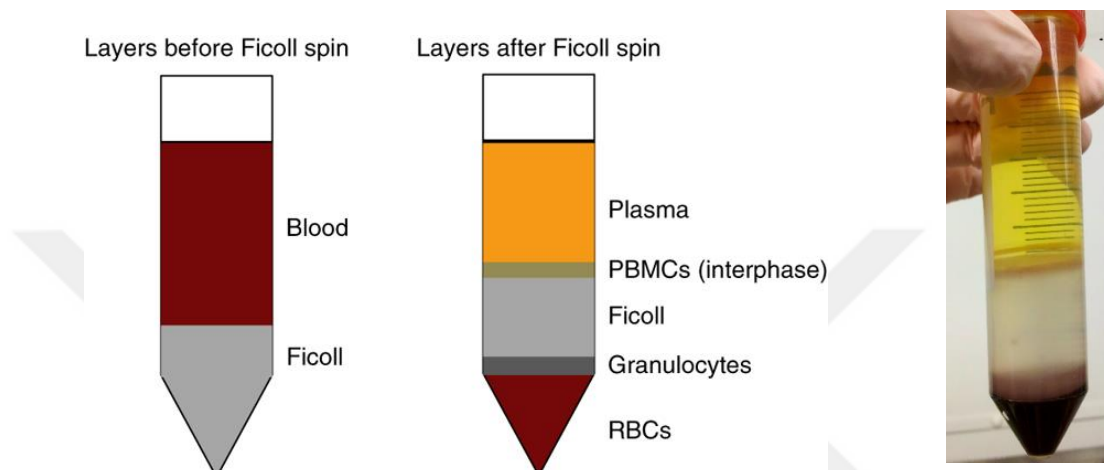
این بافر برای سنگین کردن محصولات PCR در چاهک ژل و اطلاع از میزان حرکت قطعات روی ژل با مقایسه میزان

حرکت رنگ استفاده شد. برای تهیه 100 میلی لیتر بافر بارگذاری، 250 میلی گرم بروموفنل بلو و یا 250 میلی گرم زایلن سیانول در 33 میلی لیتر Tris 150 میلی مولار (pH=7/6) حل شده، سپس 60 میلی لیتر گلیسرول و 7 میلی لیتر H_2O به آن اضافه شد. بافر بارگذاری حاصل در یخچال نگهداری شد.

3-7- روش فایکول:

افزودن 4 سی سی از خون به لوله های فالكون 15 سی سی. به منظور رقیق سازی خون، به همان مقدار محلول PBS (که از قبل آماده کرده ایم) روی نمونه خونی افزوده شد. چندین بار لوله حاوی نمونه خونی رقیق شده وارونه گردید. در یک لوله فالكون دیگر به مقدار 3 تا 4 سی سی فایکول ریخته شد. نمونه خون رقیق شده به آرامی با یک سمپلر از لبه لوله روی فایکول ریخته شد (طبق شکل) سپس نمونه های خونی قرار گرفته روی فایکول به آرامی در داخل سانتریفیوژ قرار داده و طبق پروتوکل با سرعت 800g به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله پس از سانتریفیوژ، نمونه ها به 4 فاز مشخص جدا می شوند: (از بالا به پایین) فاز اول یا بالایی: حاوی پلاسمای خون به رنگ زرد فاز دوم: حاوی سلول های تکه هسته ای، کدر رنگ، خیلی نازک (در حدود 1-3 میلی متر) فاز سوم: فایکول

فاز چهارم یا پایینی: گلبول‌های قرمز به همراه گرانولوسیت‌ها



شکل 1-3- روش فایکول و فازهای تشکیل شده آن.

به منظور جداسازی سلول‌های تکه‌سته‌ای، فاز میانی را با استفاده از سمپلر 100 میکرو به آرامی، بدون اینکه منجر به هم زدن فازها گردیم، جدا کرده و به یک لوله فالكون جدید انتقال می‌دهیم. در این مرحله سعی خواهیم کرد که تمام محتویات فاز میانی را به لوله جدید منتقل کنیم.

به منظور جداسازی پلاسمای خون نیز فاز بالایی را با استفاده از سمپلر 1000 میکرو برداشته و به یک میکروتیوب 2 میلی لیتری منتقل می‌کنیم.

برای شستشو دادن سلول‌ها، حجم سلول‌های تکه‌سته‌ای برداشت شده را توسط PBS به 10 میلی لیتر می‌رسانیم. پس از افزودن PBS روی سلول‌ها، چندین بار لوله را وارونه می‌کنیم تا محتویات درون لوله به خوبی مخلوط گردند.

نمونه سلول‌ها که توسط PBS رقیق شده‌اند، دوباره درون دستگاه سانتریفیوژ گذاشته و با سرعت 800G به مدت 5-10 دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم.

سوپرناتانت آن را دور ریخته، سلول‌های رسوب داده شده را به منظور استخراج RNA یا DNA برمی‌داریم. در صورتیکه سلول‌ها حاوی گلبول قرمز باشند، مرحله قبل یعنی شستشو را دوباره تکرار خواهیم کرد.

3-8- مراحل مربوط به استخراج DNA:



شکل 2-3- روش استخراج DNA

3-9- تعین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده :

پس از استخراج DNA لازم است، کیفیت و کمیت DNA استخراج شده تعیین گردد. برای تعیین مقدار DNA معمولاً از دو روش اسپکتروفتومتری یا الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده می‌شود.

1-9-3- روش اسپکتروفتومتری :

برای این کار از دستگاه نانودراپ استفاده گردید. بطوریکه حجم معینی از DNA استخراج شده را با آب مقطر یا بافر TE (همان حلالی که DNA داخل آن حل شده است) رقیق کرده و به حجم خاصی رسانده شد. نسبت مذکور فاکتور رقت¹¹ نامیده می‌شود. سپس با استفاده از نانودراپ کیفیت DNA معین شد. مقادیر کمتر از 1.8 نشانگر وجود آلودگی‌های پروتئینی، فنلی و یا دیگر جذب‌کننده‌های اشعه‌ی ماوراءبنفش است. مقادیر بیشتر از 2 نیز نشانگر وجود RNA در نمونه‌ی استخراج شده است.

پس از انتخاب محلول‌هایی که نسبت جذبی آنها در محدوده‌ی موردنظر باشد، از اعداد مربوط به طول موج 260 نانومتر جهت محاسبه میزان غلظت DNA طبق روابط زیر استفاده می‌گردد:

از آنجائیکه هر یک واحد جذب در طول 260 نانومتر متناظر با حدود 50 ng/ml از DNA دو رشته‌ای می‌باشد برای تعیین مقدار DNA می‌توان از فرمول زیر استفاده کرد.

$$\text{غلظت DNA (ng/ml)} \times 50 = \text{ضریب رقت} \times 260A$$

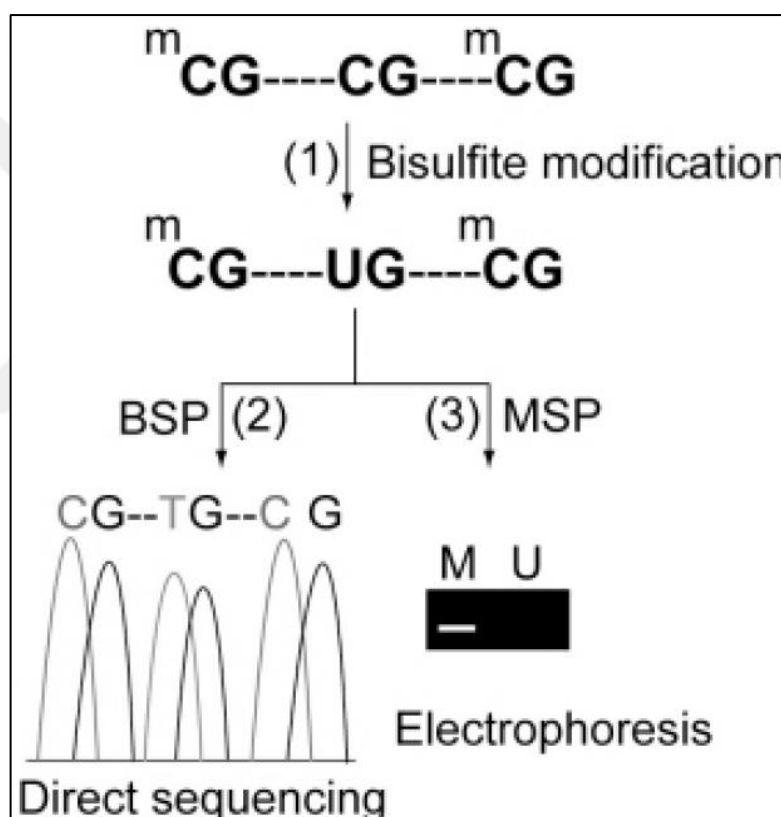
نمونه‌های DNA استخراج شده به کمک دستگاه نانودراپ بررسی گردید. در بیشتر موارد کیفیت نمونه‌ها مطلوب بود یعنی نسبت A_{260} / A_{280} ، مناسب و بین 1.8 تا 2 بود. برای بهینه کردن PCR ابتدا PCR استاندارد را انجام داده و سپس با توجه به محصولات PCR اقدام به تغییر شرایط PCR نمودیم. در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی متفاوت، بهترین دمای اتصال آغازگرها به رشته الگو به دست آمد و در مرحله بعد جهت ظهور باکیفیت باندها و حذف اسمیر، غلظت $MgCl_2$ و DNA ژنومی بهینه‌سازی شد.

3-10- روش QMS-PCR:

DNA ی مربوط به سلول‌های تک هسته ای نمونه‌ها، بر اساس پروتکل شرکت سازنده کیت با روش Salting out استخراج شده و برای اندازه‌گیری سطح متیلاسیون ژن‌ها از تکنیک MSP (Methylation specific PCR) استفاده شد.

PCR خاص متیلاسیون (MS-PCR) متکی به آمپلیفیکاسیون برای ارزیابی وضعیت متیلاسیون در جایگاه‌های CpG خاص می‌باشد. موفقیت با این سیستم بستگی به آمپلیفیکاسیون افتراقی میان پرایمرهای طراحی شده برای نواحی متیله با نواحی غیرمتیله دارد. درحالی‌که بیشتر ملاحظات برای طراحی پرایمر در این روش نیز یکسان است، اما تریتمنت نواحی CpG در درون پرایمر کاملاً متفاوت می‌باشد. برای MSP، در پرایمرهای متیله؛ وجود سیتوزینها در انتهای 3' جایگاه-های CpG پرایمرها و در پرایمرهای غیرمتیله، وجود تیمین‌ها در انتهای 3' پرایمرها خیلی ضروری است.

به منظور اجرا موفق این روشها، مهم‌ترین گام، طراحی کردن پرایمرها برای DNA مدیفای شده می‌باشد. وجود برنامه‌هایی برای PCR استاندارد نمی‌تواند طراحی پرایمر را برای PCR خاص BSP راه‌اندازی کند. بدین منظور برای طراحی پرایمر برای BSP، ناحیه درون پرایمرها نباید حاوی جایگاه CpG باشد در حالیکه در پرایمرهای مربوط به MSP، حتماً باید حاوی یک جایگاه CpG باشد.



شکل 3-3- روش QMS-PCR. خلاصه شماتیک مربوط به تکنیک

متیلاسیون

در این روش در ابتدا DNA توسط سدیم بی‌سولفیت تریت شد که باعث تبدیل رزیدوهای سیتوزینی به یوراسیل در تک رشته DNA می‌گردد. تحت این شرایط جایگاه‌های 5mC بدون تغییر باقیمانده در صورتیکه جایگاه‌های حاوی سیتوزین

غیرمتیله به یورا سیل تبدیل شدند. سپس توسط نرم افزارهای طراحی پرایمر خاص MSP، هم برای توالی‌های متیله و هم برای توالی‌های فاقد جایگاه متیله پرایمر طراحی گردید. در این روش همچنین به منظور کمی‌سازی میزان متیلاسیون جایگاه مورد نظر، به دنبال ژل الکتروفورز، مقادیر کمی جایگاه‌های متیلاسیون و غیرمتیلاسیون توسط روش Real-time PCR مورد آنالیز قرار گرفتند. سپس توسط مقادیر CT^2 که توسط دستگاه ارائه شد، مورد آنالیز قرار گرفتند. همچنین به منظور کنترل کردن، اینکه نمونه‌ها به دنبال تیمار بی‌سولفیت، تحت تاثیر قرار می‌گیرند یا نه، و اینکه پرایمرهای متیله و غیرمتیله ما واقعا به جایگاه‌های مورد نظر متصل می‌شوند یا نه، نیاز به نمونه‌های DNAی کنترل متیله و غیر متیله داشتیم. تا در نهایت به دنبال ژل الکتروفورز، مشخص گردد که پرایمرهای متیله ما فقط به جایگاه‌های متیله و پرایمرهای غیرمتیله فقط به جایگاه‌های غیرمتیله متصل می‌شوند.

همچنین در این روش، به منظور بالا بردن اختصاصیت پرایمرها، توسط نرم افزارهای مختلفی همانند Oligo مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت به منظور سنتز، به شرکت‌ها سفارش داده شد. با این وجود در صورت مشاهده اتصالات غیر اختصاصی پرایمرهای طراحی شده، سریعاً پرایمرها را مورد ارزیابی قرار داده و به دنبال تغییرات مورد نیاز، دوباره سفارش داده شد.

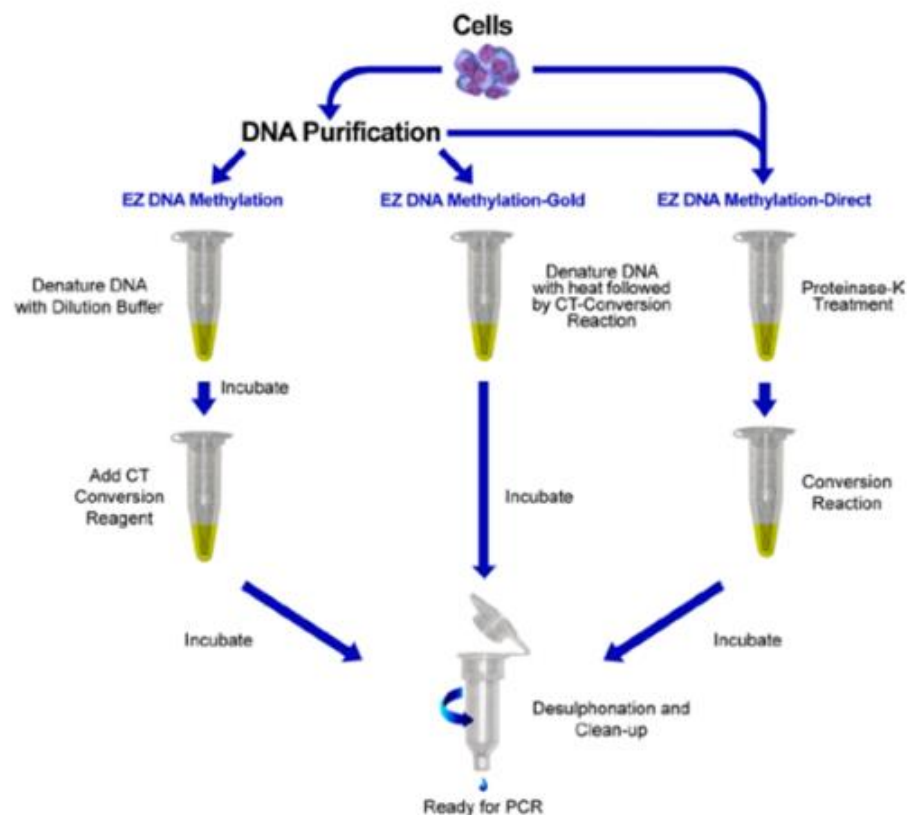
² Cycle Threshold

متیلاسیون جایگاه‌های مورد نظر توسط تکنیک QMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. خلاصه روش اجرای مطالعه به صورت فلوجارت در شکل زیر نشان داده شده است (شکل 3-4).

3-11- پروتوکل مربوط به MSP-PCR کیت Zymo:

این کیت قادر است که تمامی نقاطی که بصورت CpG-rich هستند را در کمتر از 3 ساعت بی سولفیت‌دهی کند. مرحله مربوط به واکنش دناتوراسیون/تبدیل همراه با گرما، تبدیل سیتوزین‌های غیرمتیله را به یوراسیل بسیار موثر و کارآمد عمل می‌کند. رسوب DNA حذف شده است. در عوض، DNA در یک مرحله با استفاده از میکروتیوپ‌های ستونی هم دسولفیت‌دهی می‌شود و هم پاکسازی می‌شوند. DNAی فوق‌العاده خالص و رقیق شده برای استفاده آنالیزهای مولکولی، ایده‌آل است. نکات آماده سازی:

به ازای هر واکنش CT conversion ، 900 میکرولیتر آب، 300 میکرولیتر M-Dilution buffer و 50 میکرولیتر M-Dissolving buffer قبل از استفاده اضافه می‌کنیم. به مقدار 96 میکرولیتر از اتانول 100% روی 24 میکرولیتر بافر M-Wash اضافه می‌کنیم.



Outline of the EZ DNA Methylation™, EZ DNA Methylation-Gold™ and EZ DNA Methylation-Direct™ Kit procedures.

شکل 4-3- شماتیک تریت کردن DNA در پروتکل مربوط به کیت زایمو.

خصوصیات کیت:

DNA ورودی: نمونه‌ها باید حاوی 500 پیکوگرم تا 2 میکروگرم DNA باشند. بهترین حالت، میزان DNA ورودی 200-500 نانوگرم می‌باشد.

بازده تبدیل: بیش از 99% سیتوزین‌های غیرمتیله به یوراسیل تبدیل می‌شوند و بیش از 99% محافظت از سیتوزین-های متیله را انجام می‌دهد.

میزان DNA Recovery: بیش از 75%

3-12- تهیه واکنشگرها:

آماده کردن واکنشگر تبدیل CT:

این ماده در داخل کیت بصورت ماده جامد می‌باشد که بایستی قبل از استفاده بصورت محلول تهیه شود. برای همین طبق پروتکل زیر عمل می‌کنیم:

افزودن 900 میکرولیتر آب، 300 میکرولیت M-Dilution Buffer و 50 میکرولیتر M-Dissolving Buffer در تیوب‌های مخصوص واکنشگر تبدیل CT به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق توسط ورتکس یا شیکر مخلوط می‌کنیم.

توجه 1: معمول است که مقدار کمی از ماده بصورت غیرمحلول در تیوب دیده شود. هر کدام از تیوب‌های واکنشگر برای تریت کردن 10 نمونه در نظر گرفته شده است.

توجه 2: این محلول نسبت به روشنایی حساس است و بنابراین باید تا حد امکان به دور از روشنایی باشد. برای گرفتن نتایج مطلوب، بهترین حالت این است که به محض آماده سازی محلول، فوراً استفاده شود. همچنین این محلول را می‌توان بصورت شبانه در دمای اتاق به منظور استفاده فوری نیز نگهداری کرد. اما در صورت نگهداری به مدت یک هفته بهتر است در دمای اتاق، و نگهداری به مدت یک ماه در دمای منفی 20 درجه نگهداری شود. قبل از استفاده از این محلول در دمای 37 باید گرم شود و سپس ورتکس گردد.

آماده سازی M-Wash buffer:

مقدار 96 میلی لیتر از اتانول 100% را روی تیوب مربوط به M-Wash Buffer می‌ریزیم.

3-13- پروتوکول اصلی:

اضافه کردن 130 میکرولیتر از واکنشگر CT روی 20 میکرولیتر از نمونه DNA در تیوب PCR. اگر حجم نمونه DNA کمتر از 20 میکرولیتر می‌باشد، ما بقی آن را توسط آب کامل خواهد شد. نمونه‌ها توسط فلیکینگ تیوب یا پیپتینگ و آپ و داون کردن مخلوط می‌گردد. سپس سانتریفیوژ می‌گردد (130 میکرولیتر از CT + 3 لاند DNA محلول در آب + 17 لاند آب = 150). نمونه‌های آماده شده را در داخل ترموسایکلر قرار داده و طبق پروتکل زیر PCR انجام می‌دهیم.

98 °C for 10 minutes

64 °C for 2.5 hours

4 °C storage up to 20 hours

برای برخی از نمونه‌ها روش‌های جایگزین پیشنهاد شده است.

به مقدار 600 میکرولیتر M-Binding buffer در داخل ستونهای Zymo-Spin IC ریخته و ستون را درون یک تیوب جمع آوری قرار می‌دهیم.

نمونه‌ها (آماده شده در مرحله 2) را درون ستون Zymo-Spin IC حاوی M-Binding buffer لوود کرده، درب ستون را بسته و توسط وارونه کردن ستون، چندین بار نمونه‌ها را مخلوط می‌کنیم.

با سرعت بیش از 10000 g به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ می-کنیم. مایع ریخته شده به تیوپ پایینی را دور می-ریزیم. به مقدار 100 میکرولیتر از بافر M-Wash را درون ستون می-ریزیم. سپس با تمام سرعت به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ می-کنیم.

با افزودن 200 میکرولیتر از بافر M-Desulphonation درون ستون، اجازه دهید به مدت 10-15 دقیقه در دمای اتاق (20-30) قرار گیرد. پس از انکوباسیون، به مدت 30 ثانیه با تمام سرعت سانتریفیوژ کنید.

سپس افزودن 200 میکرولیتر بافر M-Wash در ستون و سانتریفیوژ با تمام سرعت به مدت 30 ثانیه. 200 میکرولیتر دیگر از بافر M-Wash افزوده و به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ کنید.

ستون را درون تیوب میکروسانتیرفیوژ قرار دهید. 10 میکرولیتر بافر M-Elution را بطور مستقیم در زمینه ستون بریزید. با تمام سرعت به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ کنید.

14-3- تهیه ژل آگارز و الکتروفورز محصولات PCR

آگارز يك پلی-ساکارید است که از واحدهای تکرارشونده آرابینوز دي-ساکارید تشکیل شده است. پودر آگارز در اثر حرارت در بافر مخصوص خود به شکل ژله ای درمی-آید. در واقع شکل مولکولهای پلیمر از حالت حلقوي نامنظم به شکل مولکولهای مارپیچی دوتایی تبدیل می-شود. این پلیمر، يك شبکه از منافذ با قطر 100 الي 300 نانومتر ایجاد می-کند که اندازه این منافذ به عوامل متفاوتی

بستگی دارد. غلظت بالاتر آگارز منافذ ریزتر به وجود می آورد که قدرت تفکیک اندازه DNA را بالاتر می برد. با توجه به وزن مولکولی قطعات تکثیرشده، سرعت حرکت آنها نیز متفاوت می باشد. قطعات کوچکتر سرعت بیشتر و قطعات بزرگتر سرعت کمتری دارند.

برای تهیه ژل آگارز پس از تعیین حجم و غلظت ژل مقدار مورد نیاز پودر آگارز را وزن کرده و سپس به اندازه کافی به آن بافر TBE1X افزوده و تا دمای جوش حرارت داده تا رنگ محلول کاملاً شفاف شود. مدتی صبر کرده تا ژل اندکی سرد شده و دمای آن به حدود 40 درجه سانتیگراد برسد، سپس ماده ایمنی³ متناسب با حجم و غلظت ژل (مطابق دستور شرکت سازنده) افزوده می شود. ماده ایمنی یک ماده چند حلقه ای خاص می باشد که قادر است به بازهای آلی متصل شود. این ماده به تنهایی فاقد خاصیت فلورسانس است ولی زمانی که به بازهای آلی متصل می شود خاصیت فلورسانس پیدا می کند و در مقابل نور UV به رنگ نارنجی دیده می شود. با قرار دادن شانه بر روی سینی، ژل را در سینی ریخته و بعد از سرد شدن، ژل در داخل تانک قرار داده می شود. سپس نمونه های مورد نظر برای الکتروفورز درون چاهک ها بارگذاری می شوند. برای بارگذاری نمونه ها در داخل چاهک ها، به نسبت پنج به یک از نمونه و بافر بارگذاری مخلوط و درون چاهک ها ریخته می شوند. با استفاده از بافر بارگذاری ویسکوزیته نمونه افزایش می یابد و انتقال نمونه به چاهک آسان می شود. با ایجاد رنگ در نمونه، انتقال آنها به چاهک با

اطمینان بیشتری انجام می‌شود. رنگ‌های مورد استفاده در بافر بارگذاری خود نیز باردار شده و همراه نمونه به سمت آند حرکت می‌نمایند.

بعد از انتقال نمونه‌ها به ژل، دستگاه الکتروفورز روشن شده و با ولتاژ 100 و به مدت 40 دقیقه الکتروفورز شد. بعد از برقراری ولتاژ، قطعات DNA از سمت قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت می‌نمایند. سرعت حرکت DNA با ولتاژ نسبت مستقیم دارد، البته این نسبت خطی نیست. ژل‌ها معمولاً در میدان الکتریکی 4-10 V/cm الکتروفورز می‌شوند که منظور از سانتیمتر فاصله میان دو الکتروود ژل است. اگر شدت میدان الکتریکی از اندازه معمول بالاتر باشد، ژل آگارز تخریب شده و باندهای DNA منتشر می‌شوند. پس از اینکه قطعات DNA به اندازه کافی حرکت کردند، دستگاه خاموش و ژل از تانک الکتروفورز خارج می‌شود. سپس درون دستگاه نور ماوراءبنفش گذاشته شده و به وسیله دوربین پلاروید از آن عکس تهیه می‌گردد.

3-15- استخراج RNA :

استخراج RNA طبق دستورالعمل ترایزول و طی مراحل زیر انجام شد :

به دنبال شمارش سلول‌های تک هسته‌ای، روی رسوب سلول‌های استخراج شده، مقدار 1 میلی لیتر ترایزول می‌افزاییم. سپس محتویات آن را با سر و ته کردن میکروتیوب حاوی نمونه‌ها و آپ-داون کردن نمونه توسط سمپلر، کاملاً هم می‌زنیم. در نهایت نمونه‌ها را در دمای اتاق به مدت 5-10 دقیقه انکوبه می‌کنیم.

روی نمونه‌ها در حدود 200 میکرولیتر (یک پنجم مقدار ترایزول) کلروفرم ریخته، و به مدت 15 ثانیه با سرعت تمام هم می‌زنیم، سپس به مدت 2-5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌کنیم.

نمونه‌ها را با سرعت 12000g به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفیوژ می‌کنیم.

به دنبال سانتریفیوژ نمونه‌ها، 3 فاز تشکیل می‌شود:

فاز بالایی (شفاف رنگ): حاوی RNA

فاز میانی (کدر و سفیدرنگ): حاوی DNA

فاز پایینی (صورتی رنگ): حاوی پروتئین

فاز بالایی را توسط سمپلر زرد به آرامی جدا کرده و به داخل میکروتیوب جدید انتقال می‌دهیم. در حدود 300-400 میکرولیتر نمونه خواهد شد.

افزودن 500 میکرولیتر ایزوپروپانول سرد روی نمونه‌ها به منظور رسوب دادن RNA انجام میشود.

نمونه‌ها را بطور محکم هم می‌زنیم و سپس به مدت 10-15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد انکوبه می‌کنیم.

نمونه‌ها را با سرعت 12000g به مدت 10 دقیقه در دمای 2-8 درجه سانتیفیوژ می‌کنیم.

سپس محلول رویی دور ریخته شده، و توسط اتانول 75% (تهیه شده توسط DEPC WATER) به مقدار 1000 میکرولیتر شستشو می‌دهیم. (سانتریفیوژ به مدت 5 دقیقه با دور 7500g).

نکته. به دنبال سانتریفیوژ و اضافه کردن محلول‌های ایزوپروپانول و اتانول ریخته شده، توسط شیکر به آرامی

رسوب را از ته میکروتیوپ جدا میکنیم و سپس به منظور سانتریفیوژ، به داخل دستگاه منتقل میکنیم.

در نهایت به دنبال شستشو، به مدت 10-20 دقیقه در زیر هود و در دمای اتاق، درب میکروتیوپ ها را باز گذاشته تا بطور کامل خشک شوند. (در صورت باقی ماندن الکل، کیفیت استخراج پائین خواهد آمد.)

در مرحله آخر، به مقدار 30-50 میکرولیتر آب RNase free روی نمونه داخل میکروتیوپ اضافه میکنیم. همچنین به مدت 10 دقیقه درون بن ماری در دمای 56 درجه میگذاریم. در نهایت به منظور نگهداری RNA ی استخراج شده به یخچال 70- منتقل میکنیم.

3-16- ساخت cDNA :

ابتدا تمام وسایل مورد نیاز شامل سمپلرها، سرسمپلرها، رکاها، میکروتیوبها، دستکش و محلولها استریل شده و زیر هود قرار داده شدند. سپس برای تمام مراحل کار میکروتیوبها مورد نظر شماره گذاری شدند. سپس مابقی آزمایش طبق روش مندرج در پروتکل کیت شرکت Thermo انجام شد که شامل مراحل زیر می باشد :

تمامی مراحل زیر بر روی پک یخ انجام میشوند.

افزودن غلظت مناسب RNA به داخل تیوب

به تعداد نمونه ها، مقدار مناسبی از استوک مربوط به پرایمر Oligo (برای هر نمونه 1 میکرولیتر) را در یک میکروتیوب جداگانه درست میکنیم.

برای هر نمونه 1 میکرولیتر پرایمر Oligo اضافه میکنیم.

حجم تمام نمونه ها را با RNase water به 12 می‌رسانیم.

نمونه‌ها را به مدت 5 دقیقه روی یخ قرار می‌دهیم. از محلول‌های مورد نظر به تعداد نمونه‌ها استوک تهیه می‌کنیم، بطوریکه به ازاء هر واکنش، 4 میکرولیتر Reaction Buffer، 1 میکرولیتر Ribolock، 2 میکرولیتر dNTP و 1 میکرولیتر آنزیم RT اضافه می‌کنیم. قبل از اضافه کردن محلول‌ها، آنها را به آرامی مخلوط و سانتریفیوژ می‌کنیم.

به دنبال تهیه استوک محلول‌ها، برای هر نمونه به مقدار 8 میکرولیتر از استوک اضافه می‌کنیم. در نهایت نمونه‌ها را توسط اسپینر، اسپین می‌کنیم تا نمونه‌ها در کف میکروتیوب جمع گردند. قبل از قرار دادن در دستگاه ترموسایکلر، دستگاه را طبق پروتکل خودمان که شامل مراحل زیر می‌باشد، تنظیم می‌کنیم:

مرحله اول: 42 درجه سانتیگراد به مدت 60 دقیقه

مرحله دوم: 70 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه

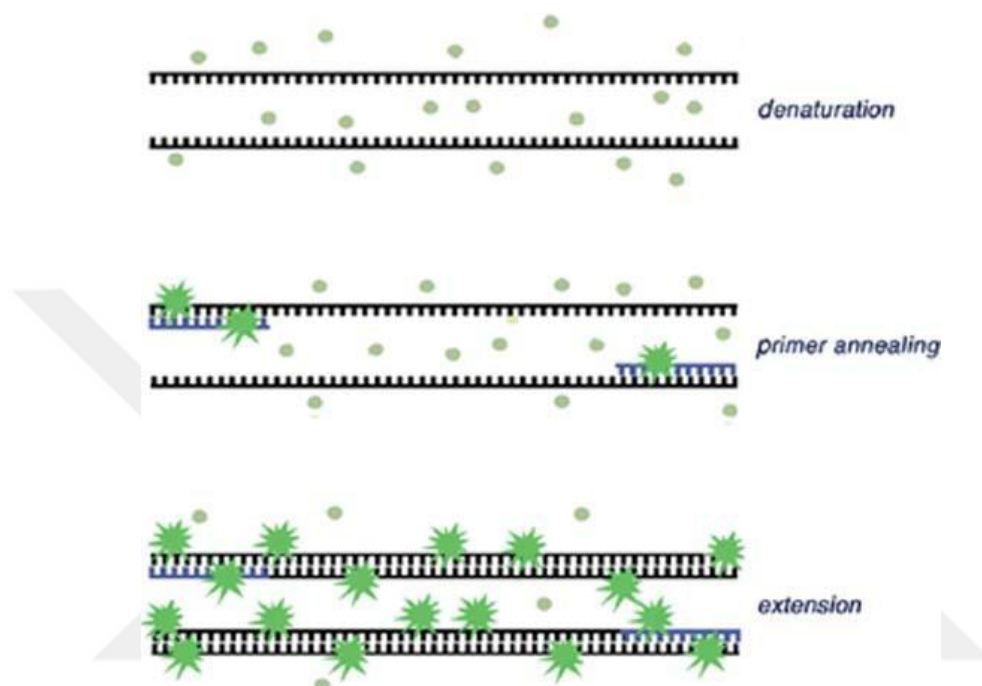
در نهایت نمونه‌ها را از دستگاه ترموسایکلر درآورده و در یخچال فریزر در دمای 20- نگهداری می‌کنیم.

3-17- تکنیک Real-time PCR:

تفاوت اصلی این روش با PCR معمولی در این است که PCR معمولی تنها نقطه پایان قابل بررسی و گزارش است، در صورتیکه در Real-time PCR امکان مشاهده پیشرفت مرحله به مرحله (به عبارتی سیکل به سیکل) وجود دارد. اصول انجام روش Real-Time PCR بر مبنای خاصیت فلوروسنت استوار

است. بدین ترتیب که با اندازه گیری فلوروسانس ایجاد شده در هر مرحله پیشروی واکنش قابل اندازه گیری است. استفاده از رنگ SYBER Green مهم ترین، پرکاربردترین و معمول ترین روش های انجام Real-time PCR است. رنگ SYBER Green از طریق اتصال به شیار کوچک DNA دو رشته ای، نور فلوروسانس منتشر می کند. به همین لحاظ هرچه واکنش پیش می رود و محصول بیشتر تکثیر می یابد SYBER Green به میزان بیشتری قادر به اتصال به محصول DNA بوده و در نتیجه میزان فلوروسانس افزایش خواهد یافت. در این روش از ژن بتا اکتین برای نرمالیزه کردن میزان بیان ژن در مقایسه دو گروه کنترل و گروه تحت تیمار استفاده می گردد زیرا بیان ژن بتا اکتین در سلول ثابت است. رنگ SYBER Green به طور غیر اختصاصی به دایمر - پرایمرهای موجود در ظرف واکنش متصل می شود که باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب می شود. راه حل این مشکل استفاده از نمودار دمایی ذوب (Melting Curve) است. برای رسم این نمودار بعد از اتمام واکنش، دما به تدریج از 50 درجه سانتیگراد به 95 درجه سانتیگراد افزایش می یابد. در دمایی پایین تمام DNA دو رشته ای است، فلوروسانس حداکثر مقدار را دارد. اما با گذشت زمان و افزایش دما، فلوروسانس به دلیل دناتوره شدن DNA دورشته کم می شود به طوریکه در نهایت به صفر می رسد. با توجه به این که هر محصولی از PCR از لحاظ توالی، طول مختص به خود را دارد در نتیجه در دمایی متفاوت اختصاصی ذوب شده و باعث تولید یک پیک اختصاصی می شود. با استفاده از منحنی ذوب وجود دایمر- پرایمر و یا هرگونه محصول غیر

اختصاصی با ایجاد پیکهای متفاوت مشخص می شود . این نمودار صحت و اعتبار واکنش و محصول بدست آمده را تایید میکند (54) .



شکل 1-3. اصول انجام Real-time PCR به روش SYBER Green :

الف) در مرحله دناتوراسیون در اثر حرارت پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل دو زنجیره DNA شکسته شده، و دو زنجیره جدا از هم تشکیل میگردد. از آنجایی که تمام DNA به صورت تک رشته ای است هیچ SYBER Green به DNA اتصال نمی یابد، چون SYBER Green فقط قادر به اتصال به DNA دورشته ای است و لذا هیچ فلورسانسی منتشر نمی کند. ب) در مرحله اتصال پرایمر به DNA به تدریج SYBER Green به پرایمر و DNA سنتز شده اتصال یافته و نشر فلورسانس آغاز می شود ج) در مرحله تکثیر که طول DNA دو رشته به تدریج افزایش می یابد

میزان اتصال SYBER Green نیز بیشتر شده و در نتیجه فلورسانس بیشتری منتشر می گردد.

تهیه ی مواد

پرایمر مورد استفاده توسط وب سایت BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) NCBI شدند که اطلاعات آن ها در جدول ذیل موجود است. تمام پرایمر ها توسط شرکت پیشگام ژن سنتز شدند.

پرایمر های مورد استفاده در Real-time PCR

Primers name	Sequence	Amplicon length	Td
SOCS1			
Forward	5-GTGACGGTGTTGATGGTAAGA-3	92	57.5
Reverse	5-CTCCACAGAGTGTTCTTGT-3		57
Beta Actin			
Forward	5'- GGTGAAGGTGACAGCAGT-3'	154	57.8
Reverse	5'- TGGGGTGGCTTTTAGGAT -3'		57.3

به ویال های حاوی پرایمرها به اندازه تعیین شده توسط شرکت، آب RNase free اضافه شد و از این ذخیره اصلی برای استفاده در کار ویال های پرایمر با غلظت 4 pmol تهیه شدند.

مقادیر مواد برای انجام Real-Time PCR به قرار زیر بود:

7 میکرولیتر

PCR master mix

4 میکرولیتر

آب RNAase free

پرایمرها

میکرولیتتر

cDNA

شده

جمع کل باید 14 میکرولیتتر باشد.

مراحل انجام Real-time PCR :

بعد از آماده سازی مخلوط فوق، برنامه زیر به دستگاه داده شد:

جدول 3-8- مراحل و دمای استفاده شده در Real-time PCR

Step	Temperature(°C)	Time (sec)	Signal acquiring
Hold	95	300	No
Denaturation cycle	95	10	No
Annealing cycle	55	30	No
Extension cycle	72	20	Yes

3-18- آنالیز اطلاعات بیان ژنی

سیکل آستانه (C_T) برای هر نمونه محاسبه شد. میزان بیان در هر نمونه برای ژن های SOCS1 و β -actin با استفاده از مقدارهای C_T محاسبه شد. بیان ژن SOCS1 نسبت به بیان ژن β -actin اندازه گرفته و در واقع نرمالیزه شد. مقادیر نرمالیزه (واحد نسبی) توسط نمونه های کنترل هر آزمایش استانداردسازی شدند. مقادیر تغییر یافته بیان ژن SOCS1 در نمونه های تیمار شده نسبت به نمونه ی کنترل

که به وسیله ی میزان بیان ژن β -actin نرمالیزه شده است، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

فرمول های محاسبات به شرح ذیل است:

$$\Delta C_T = C_{Ttarget} - C_{Treference}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{Ttest sample} - \Delta C_{Tcontrol sample}$$

$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3-9-3. رسم منحنی استاندارد

برای رسم منحنی استاندارد از یکی از نمونه های cDNA با نسبت های 1 به 5 سریال رقت تهیه نموده و طبق شرایط ذکر شده در جدول 4 عمل شد.

3-19- ملاحظات اخلاقی:

این مطالعه روی بیماران مبتلا به سندرم بهجت (بر اساس معیارهای تشخیصی ICBD) مراجعه کننده به پزشک متخصص روماتولوژی، در بیمارستان امام رضا و کلینیک درمانی آتیه در سالهای 94-96 انجام شد. با مشورت مشاور آماری طرح، تعداد نفرات مورد مطالعه 50 نفر از افراد مبتلا و 60 نفر گروه کنترل فاقد بیماری بهجت مراجعه کننده به آزمایشگاه بطور تصادفی انتخاب شد. قبل از خونگیری تمامی افراد مورد مطالعه از روند تحقیق آگاه شده و از آنها به منظور حفظ و رعایت اخلاق در تحقیق، فرم رضایت نامه گرفته شد.

در ابتدای مطالعه اهداف به طور کامل به بیماران توضیح داده شد و فرم رضایت نامه کتبی توسط افراد شرکت کننده

در مطالعه تکمیل شد. اطلاعات دریافت شد کاملاً محرمانه بوده و در صورت عدم تمایل فرد به ادامه همکاری هیچگونه محدودیتی وجود نداشت.

3-20- آنالیز آماری

برای محاسبات آماری این مطالعه از نرم افزار SPSS 17 استفاده شد و تفاوت بیان ژن های هدف، بین نمونه های کنترل و تیمار شده با روش های آماری Tukey's test محاسبه گردید. اطلاعات به صورت $mean \pm standard deviation (SD)$ نمایش داده شده اند. سطح $p < 0.05$ برای معیار معنی داری در نظر گرفته شده است.

فصل چہارم :

نتائج



جمع‌آوری داده‌های عمومی پژوهش بر اساس فرم جمع‌آوری اطلاعات گروه‌های مختلف بیماران صورت گرفت و جمع‌آوری نتایج و داده‌های دو گروه از طریق آزمایشات ذکر شده در فصول قبل تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق نرم‌افزار SPSS17 و با استفاده از آزمون‌های آماری Tukey's test و کای دو انجام پذیرفت.

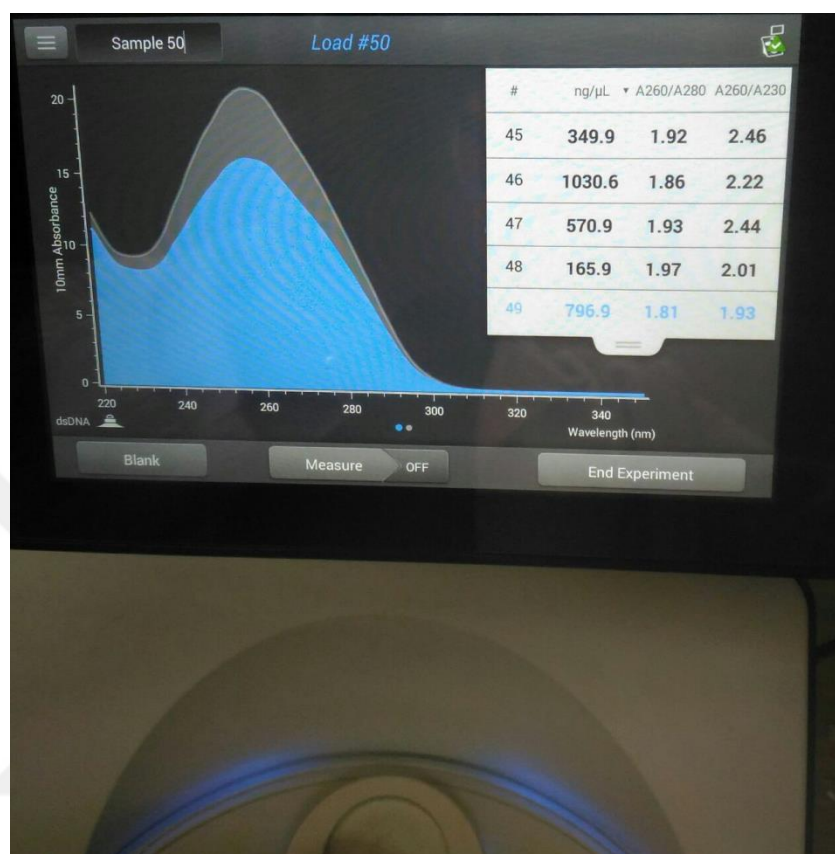
4-1 نتیجه بررسی DNAی استخراج شده

DNA و RNA به ترتیب با استفاده از ترايزول و پروتکل RGDE⁴ استخراج شده و با استفاده از دستگاه فتونانومتر مقدار و خلوص DNA تعیین و جذب نوري (OD: optical density) در طول موج‌هاي $\frac{260}{230}$, $\frac{260}{280}$ مشخص شده و از نمونه‌هایی که نسبت $\frac{260}{280}$ OD، میان 2/3 - 1/8 و نسبت $\frac{260}{230}$ OD، میان 1/9 - 1/7 داشتند جهت انجام Real-time PCR و qMSP استفاده شدند (جدول 1-4).

⁴Rapid Genomic DNA Extraction

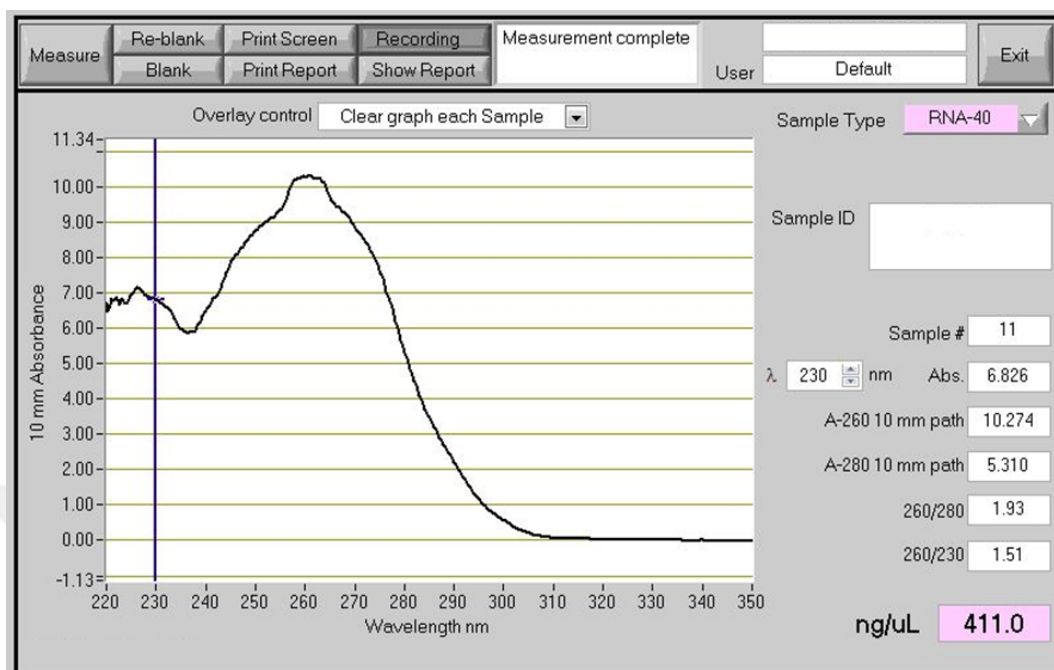
جدول 1-4 برخی از مقادیر OD 260/280 و غلظت Total DNA
استخراج شده

مقادیر OD _{260/280} و غلظت DNA های استخراج شده در برخی نمونه‌ها			
Samples		OD _{260/280}	ng/μl
Patients	1	1.92	349
	2	1.91	445
	3	1.83	482
	4	1.74	411
	5	1.93	725
	6	1.97	166
	7	1.78	388
	8	1.69	320
	9	1.81	420
	10	1.98	285
	11	1.79	385
	12	1.75	348
controls	1	1.86	1030
	2	1.93	570
	3	1.83	260
	4	1.82	370
	5	1.90	563
	6	1.93	258
	7	1.74	670
	8	1.85	360
	9	1.64	460
	10	1.78	390
	11	1.89	495
	12	1.77	375



شکل 1-4 مربوط به منحنی OD نمونه های داده شده توسط دستگاه نانودراپ

همانطوریکه در شکل 2-4 نیز مشخص می‌باشد، یکی از نمونه‌های سنجیده شده، جهت تایید در اینجا آورده شده است. غلظت آن 411 نانوگرم در هر میکرولیتر می‌باشد و مقدار OD ی 260/280 آن نیز در حدود 1.9 می‌باشد.



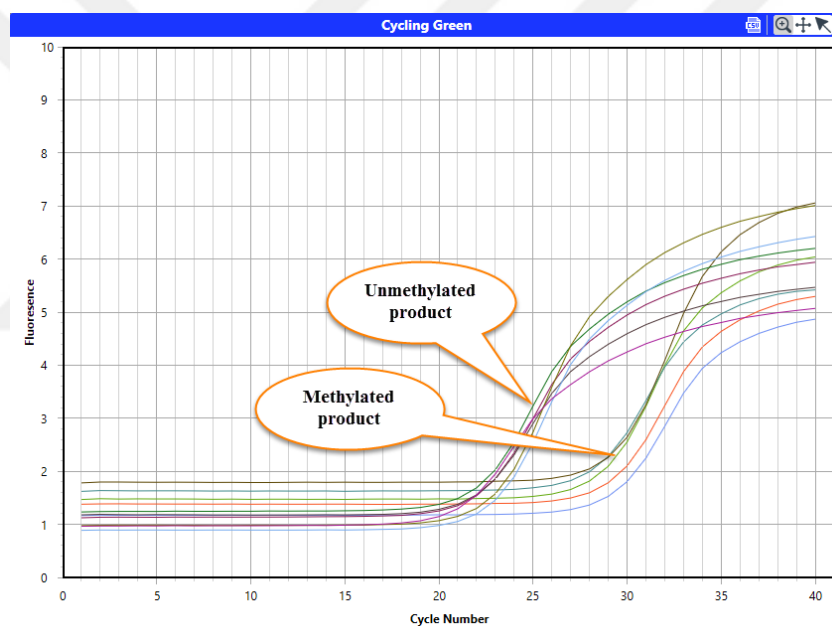
شکل 2-4 منحنی OD نمونه های داده شده به دستگاه نانودراپ

2-4 نتایج Real-time PCR مربوط به نمونه های متیله و غیرمتیله در qMSP:

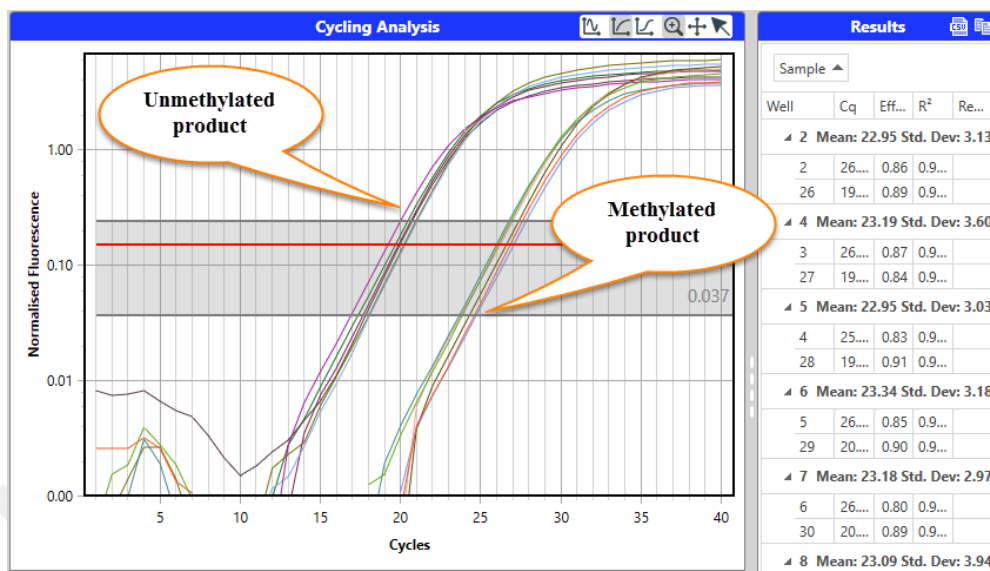
به دنبال انجام Real-time، نتایج آن مورد آنالیز و ارزیابی قرار گرفته و در صورت داشتن هرگونه ایراد، آنها دوباره تکرار شدند. همچنین تمامی نمونه ها بصورت تریپلیکیت (سه باره) انجام شدند.

به منظور آنالیز دقیق Real-time از نمودارها و اشکال مربوط به تشعشع فلورسانت، شکل های مربوط به اعداد CT و نمودار دمای ذوب (Melting Curve) استفاده شد. همانطوریکه در شکل مربوط به فلورسانت مشخص می باشد، این اشکال بایستی بصورت سیگموئیدی و شارپ برای هر نمونه باشد (شکل 3-4). در این شکل هرچقدر مقادیر اولیه (copy

number) بیشتر باشد، نمودار زودتر شروع به بالا رفتن می‌کند. در همین راستا، در شکل و نمودار مربوط به اعداد CT نیز به همین منوال می‌باشد بصورتیکه در مورد نمونه‌های غیرمتیله (بیشتر در نمونه‌های گروه کنترل)، از آنجاییکه در این ژن یعنی SOCS1 بیشتر بصورت غیرمتیله بوده، مقادیر (میزان بیان) آنها بالا بوده و CTی آنها کوچکتر (سریعتر بالا می‌روند) می‌باشند (شکل 4-4).

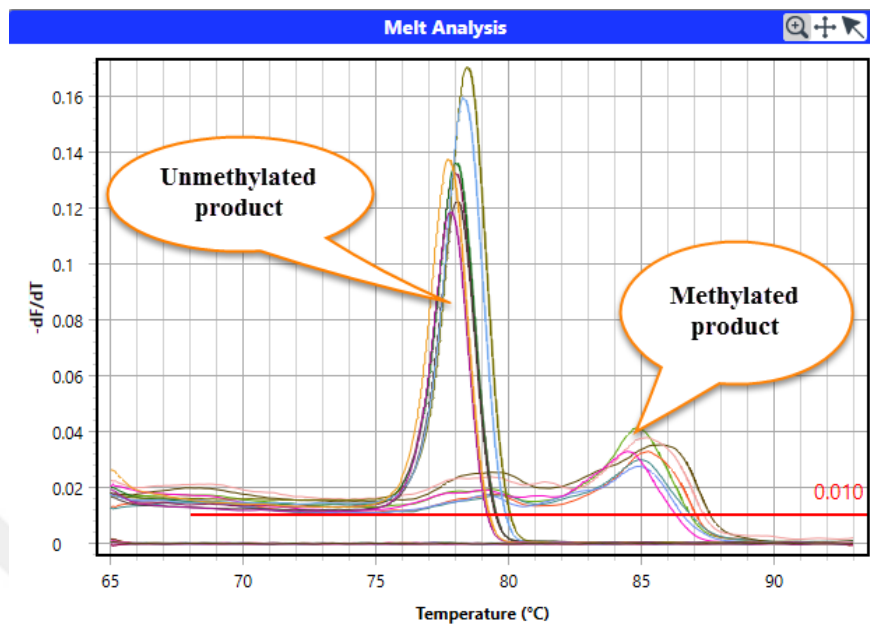


شکل 3-4 منحنی مربوط به *cycling green* در پرایمرهای متیله و غیرمتیله.

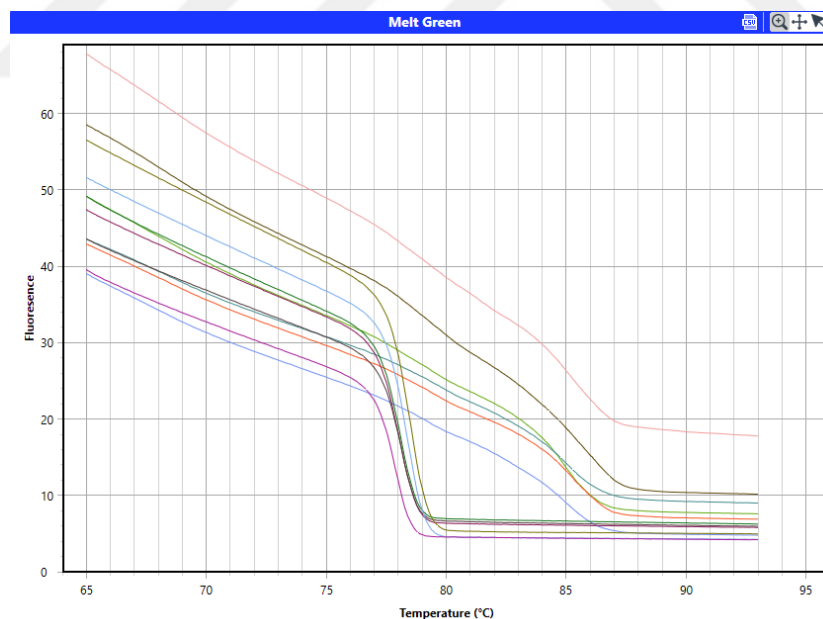


شکل 4-4 منحنی مربوط به اعداد CT (Cycling threshold) در نمونه‌ها با پرایمرهای متیله و غیرمتیله

شکل و نمودار مربوط به دمای ذوب (شکل 4-5) بعنوان یکی از مهم‌ترین خروجی‌های مربوط به Real-time می‌باشد. این شکل بعنوان نشان‌دهنده اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده در PCR می‌باشد. همانطوریکه در شکل پایین نیز مشخص می‌باشد، در این آزمایش، برای تک تک نمونه‌ها، از دو جفت پرایمر متیله و غیرمتیله استفاده گردید. همانطوریکه در شکل پایین نیز مشخص می‌باشد برای بیشتر نمونه‌ها پرایمرهای غیرمتیله کاملاً اختصاصی چسبیده و دارای پیکهای شارپ می‌باشند. یعنی اینکه اکثر نمونه‌ها، بصورت غیرمتیله می‌باشند.



شکل 4-5 نمودار مربوط به *Melting curve* که نشان‌دهنده اختصاصیت پرایمرها و نمونه‌های مورد نظر



شکل 4-6 نمودار مربوط به *HRM* مربوط به پرایمرها و محصولات (متیله و غیرمتیله).

جدول 2-4 جدول خروجی مربوط به برخی از نمونه ها،
مقادیر efficiency در Real-time.

Well	Sample Name	Cq	Efficiency	Efficiency R ²	Result
2	2-M	26.08	0.86	0.99999	Success
3	4-M	26.79	0.87	0.99997	Success
4	5-M	25.98	0.83	0.99998	Success
5	6-M	26.52	0.85	0.99998	Success
6	7-M	26.15	0.80	0.99992	Success
7	8-M	27.03	0.84	0.99998	Success
26	2-UM	19.81	0.89	0.99997	Success
27	4-UM	19.59	0.84	0.99999	Success
28	5-UM	19.92	0.91	0.99983	Success
29	6-UM	20.16	0.90	0.99995	Success
30	7-UM	20.22	0.89	0.99997	Success
31	8-UM	19.15	0.84	0.99999	Success

همچنین با توجه به اینکه این دستگاه قابلیت این را دارد که برای تک تک نمونه ها Efficiency جداگانه ای را با توجه به Slope منحنی ها بکشد، در نتیجه دیگر نیازی به رسم منحنی استاندارد به منظور پیدا کردن میزان Efficiency برای کل آزمایش نمی باشد.

3-4 نتایج مربوط به اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران:

بر اساس تجزیه و تحلیل داده های دموگرافیک، تفاوت معنی داری در میانگین سن و همچنین جنس در بین دو گروه بیماران مبتلا به بهجت و افراد سالم مشاهده نگردید؛ در گروه بیماران 29 نفر مرد و 18 نفر زن وجود داشت که میانگین سنی آنها در حدود 38.02 ± 10.25 بودند. همچنین در

گروه سالم 37 نفر مرد و 24 نفر زن که میانگین سنی آنها 37.4 ± 8.5 بود (جدول 2-4).

جدول 3-4 اطلاعات دموگرافیک و مشخصات بالینی افراد بیمار و گروه سالم.

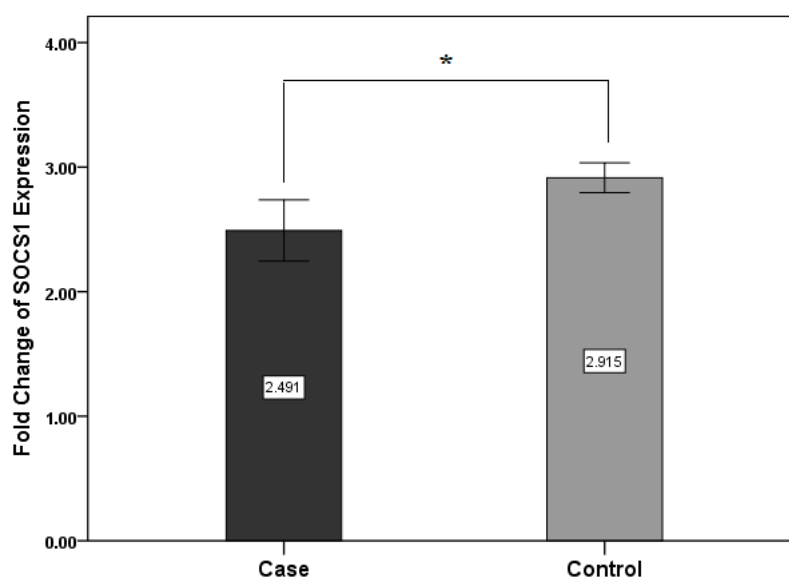
Characteristics and Clinical features	BD patients (n = 47)	Controls n (%)
Age (mean $\pm$ SD) years	38.025 $\pm$ 10.25	37.4 $\pm$ 8.5
Gender (male:female) (%)	(29) 61.7% : (18) 38.3%	(37) 60.6% : (24) 39.4%
HLA-B5-Positive	17 (37%)	
HLA-B51-Positive	13 (28%)	
HLA-B27-Positive	3(6%)	
Oral aphtha	45 (95%)	
Genital ulcer	23 (48.9%)	
Arthritis	9 (19%)	
dermitis	11 (23.4%)	
Sever B.D	30 (63.8%)	
Severe eye involvement	10 (21.7%)	

4-4 میزان بیان ژن و متیلاسیون SOCS1:

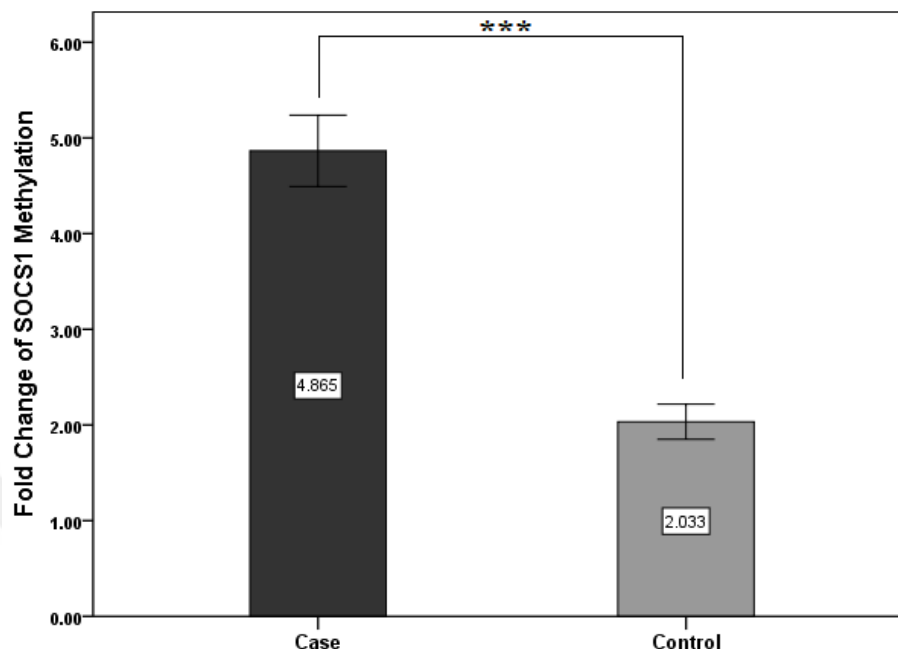
به منظور آنالیز مقایسه میانگین بیان ژن و میزان متیلاسیون با توجه به نرمال بودن توزیع مقادیر مربوط به بیان ژن و میزان متیلاسیون در ژن SOCS1، از آزمون تی مستقل (independent samples T-test) استفاده گردید. نتایج

مشخص کرد که میانگین بیان ژن در گروه بیمار (2.49 ± 0.83) و در گروه سالم (2.91 ± 0.46) بود که باهمدیگر اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($p < 0.05$) (جدول 4-1).

همچنین میزان متیلاسیون در گروه بیمار (4.8 ± 1.27) و در گروه سالم (2.03 ± 0.71) بود که باهمدیگر اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($p < 0.001$) (نمودار 4-2).



نمودار 4-1 میزان بیان ژن SOCS1. مقایسه میزان بیان ژن SOCS1 در دو گروه افراد با بیماری بهجت و گروه افراد سالم مشخص کرد که میزان بیان ژن در گروه افراد بیمار نسبت به گروه سالم کاهش دارد.



نمودار 4-2 میزان متیلاسیون SOCS1. مقایسه میزان متیلاسیون SOCS1 در دو گروه افراد با بیماری بهجت و گروه افراد سالم مشخص کرد که میزان متیلاسیون در گروه افراد بیمار نسبت به گروه سالم افزایش دارد.

4-5 ارتباط میزان بیان ژن و متیلاسیون با مشخصات کلینکوپاتولوژی بیماران:

در نمونه های بیمار، ما به بررسی ارتباط میان بیان ژن و میزان متیلاسیون با مشخصات بالینی نیز پرداختیم. همانطوریکه نتایج نشان داده است، میزان بیان ژن فقط از نظر شدت بیماری بهجت (severe BD) با همدیگر اختلاف معنی داری دارند بطوریکه در افراد با severe BD مثبت نسبت به افراد گروه منفی کاهش معنی دار نشان داده است ($p\text{-value} < 0.05$). همچنین نتایج مشخص کرد که میزان متیلاسیون در هیچ کدام از زیرگروه های اشاره شده در جدول، تفاوت معنی داری نداشتند ($p\text{-value} > 0.05$) (جدول 4-4).

جدول 4-4 ارتباط میزان بیان ژن و متیلاسیون آن با
مشخصات بالینی و آزمایشگاهی بیماران.

Characteristics and Clinical features expression	Frequency	Methylation level of SOCS1 expression (mean $\pm$ SD)	P-value	Change fold of SOCS1 expression (mean $\pm$ SD)	P-value
Age					
<45	32 (69%)	5.02 $\pm$ 1.27	0.207	2.34 $\pm$ 0.85	0.08
$\geq$ 45	15 (31%)	4.5 $\pm$ 1.2		2.8 $\pm$ 0.71	
Gender					
Male	66(61.1%)	3.31 $\pm$ 1.91	0.685	2.71 $\pm$ 0.68	0.668
female	42(38.9%)	3.18 $\pm$ 1.39		2.76 $\pm$ 0.68	
HLA-B5-					
Positive	17 (65.4%)	5.02 $\pm$ 0.87	0.265	2.77 $\pm$ 0.65	0.685
Negative	9 (34.6%)	4.54 $\pm$ 1.2		2.89 $\pm$ 0.71	
HLA-B51					
Positive	8 (46.7%)	4.98 $\pm$ 1.14	0.888	2.54 $\pm$ 0.69	0.265
Negative	7 (53.3%)	4.91 $\pm$ 0.88		2.95 $\pm$ 0.67	
HLA-B27					
Positive	2 (8.3%)	3.59 $\pm$ 2.39	0.572	2.81 $\pm$ 0.49	0.891
Negative	22 (91.7%)	4.94 $\pm$ 0.89		2.72 $\pm$ 0.82	
Oral aphtha					
Positive	45 (96%)	4.83 $\pm$ 1.28	0.466	2.49 $\pm$ 0.82	0.953
Negative	2 (4%)	5.51 $\pm$ 0.85		2.45 $\pm$ 1.41	
Genital ulcer					
Positive	24 (51%)	4.8 $\pm$ 1.51	0.744	2.48 $\pm$ 0.95	0.956
Negative	23 (49%)	4.92 $\pm$ 0.98		2.49 $\pm$ 0.71	
Pathergy					
Positive	8 (24%)	4.61 $\pm$ 1.31	0.388	2.42 $\pm$ 0.59	0.371
Negative	25 (76%)	4.97 $\pm$ 0.91		2.71 $\pm$ 0.84	
Sever B.D					

Positive	26 (55%)	4.85±1.35	0.941	2.29±0.91	0.05
Negative	21 (45%)	4.88±1.19		2.73±0.67	
Severe eye involvement					
Positive	10 (22%)	5.37±1.62	0.181	2.49±0.92	0.999
Negative	36 (78%)	4.76±1.14		2.49±0.83	

با توجه به نتایج مربوط به میزان بیان و متیلاسیون SOCS1 در این مطالعه، ممکن است که یکی از مکانیسم‌های تنظیمی دخیل در تنظیم بیان ژن، متیلاسیون ژن باشد. با توجه به اینکه در گروه بیمار با کاهش میزان بیان SOCS1، میزان متیلاسیون آن افزایش نشان داده است (هایپرمتیلاسیون) در صورتیکه در افراد گروه سالم با افزایش میزان بیان ژن SOCS1، میزان متیلاسیون آنها در مقایسه با افراد گروه بیمار کاهش نشان می‌دهد (هیپومتیلاسیون). همچنین همین نتایج در مورد ارتباط میزان بیان ژن، متیلاسیون آن و ویژگی‌های بالینی صدق میکند، بطوریکه در مورد بیماران با شدت بالا، میزان بیان ژن آنها کاهش نشان داد. در صورتیکه در مورد افراد با شدت بیمار پایین این نتایج برعکس می‌باشد (جدول 4-4).

فصل پنجم :

بحث و نتیجه گیری



اگر چه اتیولوژی این بیماری هنوز ناشناخته مانده است اما اعتقاد بر این است که بیماری بهجت با فاکتورهای محیطی مثل عوامل میکروبی در افراد دارای زمینه ژنتیکی خاص شروع می شود. واکنش متقابل بین ژنتیک و فاکتورهای محیطی ممکن است اساس بیماریزایی در افراد مبتلا به این بیماری باشد. شیوع سندرم بهجت عمدتاً در کشورهای است که در طول جاده ابریشم قرار گرفته اند (24, 25). تحقیقات اخیر نشان داده است که علاوه بر ژنتیک شواهدی قوی مبنی بر نقش اپی ژنتیک در پاتوژنز بیماریهای خود ایمنی وجود دارد. اپی ژنتیک به درک و شناخت بیماریهای پیچیده کمک می کند (55). یکی از بیومارکرهای اپی ژنتیکی که به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است، متیلاسیون DNA است. مطالعات اپی ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف نشان داده است که بین فاکتورهای دموگرافیک و الگوی متیلاسیون ژنوم ارتباط وجود دارد (56).

سایتوکاین‌ها نقش بسیار حیاتی در ایمنی ذاتی و اکتسابی بازی می‌کند. با این حال، افزایش سایتوکاین‌ها یا اختلال سیگنالینگ آنها موجب بیماری‌های مختلفی مانند آلرژی، بیماری‌های خودایمنی، التهاب و سرطان می‌گردد. اکثر سایتوکاین‌ها از مسیر سیگنال جنئوس-کیناز (JAK) و فاکتورهای فعال‌کننده رونویسی استفاده می‌کنند. این مسیر توسط مکانیسم‌های مختلف شامل پروتئین‌های SOCS (مهارکننده‌های سیگنال سایتوکاین‌ها)

بطور منفی تنظیم می‌شود. پروتئین SOCS به گیرنده‌های JAK یا سایتوکایینی متصل شده، در نتیجه مهار رویدادهای سیگنالینگ رخ می‌دهد. مخصوصاً مهارکننده‌های SOCS1 و SOCS3 بعنوان قوی‌ترین مهارکننده‌های JAK می‌باشند چراکه حاوی 2 ناحیه کیناز مهاری در انتهای N هستند. تحقیقات با استفاده از موش‌هایی که در آنها برخی از ژنها ناک‌آوت شده بودند نشان داد که پروتئین‌های SOCS بعنوان عامل اصلی فیزیولوژیک و تنظیم‌کننده پاتولوژیک در هموستازی سیستم ایمنی مطرح می‌باشند (57).

تغییرات اپی ژنتیکی مثل متیلاسیون DNA برای کنترل بیان ژن بویژه تثبیت یک رده سلولی ضروری هستند. بنابراین تغییرات اپی ژنتیک یک فاکتور مهم در ایجاد و توسعه سلول‌های T تنظیمی به شمار می‌روند (58). سایتوکایین‌های مختلفی مانند اینترفرون‌ها، اینترلوکین-ها و فاکتورهای تحریک‌کننده کلنی به خانواده بزرگ گیرنده‌های سایتوکایینی نوع I/II روی غشا متصل می‌شوند و از طریق دمین‌های پروگزیمال غشایی JAK3 منجر به فسفریلاسیون آنها می‌شود. (3) گروهی از خانواده پروتئینی مهارکننده سیگنالینگ سایتوکایین‌ها که نقش کلیدی در تنظیم منفی انتقال سیگنالینگ سایتوکایین‌ها بازی می‌کنند، خانواده پروتئینی SOCS ها هستند. این پروتئین‌ها در فیدبک منفی، بعنوان مهارکننده مسیر سیگنالینگ JAK/STAT ها عمل می‌کند و بعنوان فعال‌کننده

این مسیر (JAK/STAT) به منظور تعدیل در پاسخ‌های سلولی عمل می‌کند (5).

معلوم شده است که SOCS1 فعالیت مهار توموری داشته و بیان مجدد ژن SOCS1 باعث مهار رشد و القا آپوپتوز سلولهای HCC می‌گردد (6). از آنجاکه هایپرمتیلاسیون مربوط به SOCS1 می‌تواند منجر به فعال شدن مسیر سیگنالینگ JAK/STAT گردد و فعال‌سازی این مسیر می‌تواند بطور مستقیم با اثرگذاری بر سایتوکاین‌های مختلف مانند اینترلوکین 6 بر روی عملکرد سلولها و به دنبال آن منجر به پاتوفیزیولوژی بیماری‌ها می‌گردد، مخصوصاً بیماری‌هایی مانند بیماری‌های اتوایمیون که بطور مستقیم با میزان سایتوکاین‌ها درگیر مرتبط، هستند (8). بنابراین در این مطالعه به بررسی میزان متیلاسیون ژن SOCS1 و نقش آن در تنظیم بیان ژن در افراد مبتلا به بهجت پرداخته شد.

نتایج مربوط به فراوانی اطلاعات بالینی-آزمایشگاهی مشخص کرد که بیشترین فراوانی مربوط به علائم بالینی مربوط به آفت‌های دهانی بود که در حدود 95% از افراد مثبت گزارش شد. ضمن اینکه مشخص شد که در حدود 63% افراد از نظر دارا بودن شدت علائم (Severe BD) و 50 درصد نیز از نظر زخم‌های ژنیتال مثبت بودند.

همچنین نتایج مربوط به میزان متیلاسیون و بیان ژن نشان می‌دهد که میزان متیلاسیون در گروه بیمار نسبت

به افراد گروه سالم افزایش نشان داده که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بوده است (نمودار 1-4). همچنین نتایج مربوط به بیان ژن مشخص کرد که میانگین بیان ژن در گروه بیماران نسبت به گروه سالم کاهش داشته که این کاهش نیز از نظر آماری معنی‌دار بود (نمودار 2-4).

همچنین نتایج مربوط به ارتباط میزان متیلاسیون و بیان ژن با مشخصات بالینی-آزمایشگاهی نشان داد که میزان بیان ژن فقط از نظر شدت بیماری بهجت (Severe BD) اختلاف داشت بطوریکه در افراد با Severe BD مثبت نسبت به افراد گروه منفی کاهش معنی‌دار نشان داده است ($P\text{-value} < 0.05$). همچنین مشخص شد که میزان متیلاسیون در هیچ کدام از زیرگروه‌های اشاره شده در جدول، تفاوت معنی‌داری نداشت ($P\text{-value} > 0.05$) (جدول 4-4).

در یک مطالعه دیگر Davey GM و همکارانش در سال 2006 به نقش تنظیم‌کننده بودن SOCS1 در التهاب سلولی پرداختند. همانطوریکه از اسمش هم مشخص می‌باشد پروتئینی است که بعنوان یک تنظیم‌کننده منفی سیگنالینگ سایتوکاین‌ها عمل می‌کند. در ابتدا به منظور توانایی مهار فسفریلاسیون و عملکرد JAK مشخص شده است. همچنین SOCS1، پروتئین‌هایی را برای تخریب توسط دستگاه پروتئوزوم هدف قرار می‌دهد (59). بیان این پروتئین را می‌توان در سطح رونویسی، ترجمه و

سطوح پروتئینی تنظیم کرد. با این وجود، طیف گسترده-ای از سایتوکاین‌ها می‌توانند بیان SOCS1 را تحریک کنند و یا توسط SOCS1 در شرایط *in vitro* مهار گردند. با استفاده از مدل‌های موشی اصلاح شده ژنتیکی آشکار شده ده که SOCS1 دارای نقش اختصاصی در تنظیم سیگنالینگ IFN- γ می‌باشد. علاوه بر این، SOCS1 نقش پیچیده‌ای در فعالسازی سلول T دارد و مطالعات آشکار کرده است که این پروتئین نقش‌های قابل توجهی در تنظیم سایتوکاین‌های IL-4، IL-12 و IL-15 دارد. بطور جالب توجهی، کار SOCS1 محدود به تنظیم مسیر سیگنالینگ JAK/STAT کلاسیک نیست چراکه SOCS1 همچنین باعث مهار انتقال سیگنالینگ سایتوکاین‌هایی مانند انسولین و گیرنده‌های TL (Toll like receptor) می‌گردد که هر یک از آنها مسیر JAK/STAT را فعال می‌کنند. شواهد نشان داده است که بیان ناصحیح SOCS1 در بیماری‌های انسانی خصوصاً در برخی از بدخیمی‌ها مشخص شده است (59).

در یک مطالعه دیگر Takahashi و همکاران در سال 2011 مشخص کردند که SOCS1 برای تنظیم عملکرد سلول‌های T توسط جلوگیری از کمبود بیان Foxp3 و همچنین تولید اینترفرون-گاما و اینترلوکین-17 ضروری می‌باشد. در این مطالعه فهمیدند که سلول‌های Treg با $Socs1^{-/-}$ مقادیر بسیار بالایی از IFN- γ تولید کرده و سریعاً

Foxp3 از دست می‌دهند. زمانی که به درون موش‌های Rag^{-/-} در شرایط in vitro منتقل می‌شوند، سلول‌های T_{reg} Socs1^{-/-} نشان داده‌اند که، STAT1 و STAT3 را بسیار فعال می‌کنند. نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که SOCS1 نقش بسیار مهمی در عملکرد و دقت سلول‌های T_{reg} داشته و این عمل را بوسیله حفظ بیان Foxp3 و مهار تولید IFN- γ و IL-17a انجام می‌دهند که به ترتیب توسط STAT3 و STAT1 هدایت می‌شوند (60).

نتیجه‌گیری نهایی:

نتایج این تحقیق نشان داد که پروموتر ژن SOCS1 در بیماران نسبت به افراد گروه سالم بصورت هایپرمتیله بوده و میزان متیلاسیون بیشتری را نشان می‌دهند. همچنین میزان بیان SOCS1 در بیماران نسبت به افراد گروه سالم کمتر دیده شد. با توجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعات شاید یکی از مکانیسم‌های تنظیمی میزان بیان ژن در SOCS1 از طریق تنظیم میزان متیلاسیون رخ داده باشد.

پیشنهادات:

بررسی همین مطالعه با نمونه های بالینی بیشتر.

بررسی میزان متیلاسیون و بیان ژن سایر ژنهای SOCS در بیماران و مقایسه آنها با افراد سالم.

بررسی میزان متیلاسیون ژنهای SOCS از طریق روشهای دقیقتر مانند توالیابی آنها.

بررسی تغییرات بیان ژن و متیلاسیون ژنها در مدل های جانوری که در آنها برخی از ژنها ناکاوت شده.

بررسی تغییرات بیان ژنهای درگیر در مسیر التهاب در رده های سلولی مختلف و مقایسه آنها در افراد مبتلا به بهجت.

بررسی این مطالعه در دیگر نژادها و اقوام ایرانی.

- .1 Hirohata S, Kikuchi H. Behçet's disease. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(3):1.
- .2 Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(21):2042-54.
- .3 Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *The Journal of Immunology*. 2007;178(5):2623-9.
- .4 O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(2):161-70.
- .5 Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock*. 2002;17(2):83-90.
- .6 Yoshikawa H, Matsubara K, Qian G-S, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature genetics*. 2001;28(1):29-35.
- .7 Inagaki-Ohara K, Hanada T, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling and inflammatory diseases. *Current opinion in pharmacology*. 2003;3(4):435-42.
- .8 Chinen T, Kobayashi T, Ogata H, Takaesu G, Takaki H, Hashimoto M, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates inflammatory bowel disease in which both IFN γ and IL-4 are involved. *Gastroenterology*. 2006;130(2):373-88.
- .9 Idil A, Gürler A, Boyvat A, Caliskan D, Özdemir Ö, Isik A, et al. The prevalence of Behçet's disease above the age of 10 years The results of a pilot study conducted at the Park Primary Health Care Center in Ankara, Turkey. *Ophthalmic Epidemiology*. 2002;9(5):325-31.
- .10 Azizlerli G, Akdağ Köse A, Sarıca R, Gül A, Tutkun İT, Kulaç M, et al. Prevalence of Behçet's disease in Istanbul, Turkey. *International journal of dermatology*. 2003;42(10):803-6.
- .11 Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's disease. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(17):1284-91.
- .12 Poon W, Verity D, Larkin G, Graham E, Stanford M. Behçet's disease in patients of west African and Afro-Caribbean origin. *British journal of ophthalmology*. 2003;87(7):876-8.
- .13 Tursen U, Gurler A, Boyvat A. Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behçet's disease. *International journal of dermatology*. 2003;42(5):346-51.
- .14 Bang D, Lee JH, Lee ES, Lee S, Choi JS, Kim YK, et al. Epidemiologic and clinical survey of Behçet's disease in Korea: the first multicenter study. *Journal of Korean medical science*. 2001;16(5):615.
- .15 Koné-Paut I, Geisler I, Wechsler B, Ozen S, Ozdogan H, Rozenbaum M, et al. Familial aggregation in Behçet's disease: high frequency in siblings and parents of pediatric probands. *The Journal of pediatrics*. 1999;135(1):89-93.
- .16 Yesudian P, Edirisinghe D, O'Mahony C. Behçet's disease. *International journal of STD & AIDS*. 2007;18(4):221-7.
- .17 Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shiina T, et al. HLA-B* 51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B* 5101 with Japanese patients with Behçet's disease. *Tissue Antigens*. 2001;58(3):181-4.
- .18 Ota M, Mizuki N, Katsuyama Y, Tamiya G, Shiina T, Oka A, et al. The critical region for Behçet disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46-

kb segment centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsatellite mapping. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64(10):1406-1410.

.19 Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Goto K, et al. Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. *Arthritis & Rheumatism*. 1999;42(9):1961-6.

.20 Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, Ombrello MJ, Abaci N, Satorius C, et al. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease. *Nature genetics*. 2010;42(8):698-702.

.21 Lew W, Chang J, Jung J, Bang D. Increased expression of interleukin-23 p19 mRNA in erythema nodosum-like lesions of Behcet's disease. *British Journal of Dermatology*. 2008;158(3):505-11.

.22 Shim J, Lee E-S, Park S, Bang D, Sohn S. CD4+ CD25+ regulatory T cells ameliorate Behcet's disease-like symptoms in a mouse model. *Cytotherapy*. 2011;13(7):835-47.

.23 Kaneko F, Oyama N, Yanagihori H, Isogai E, Yokota K, Oguma K. The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behcet's disease. *European Journal of Dermatology*. 2008;18(9):489-95.

.24 Kaya TI. Genetics of Behcet's disease. *Pathology research international*. 2011;2012.

.25 Karasneh J, Gül A, Ollier WE, Silman AJ, Worthington J. Whole-genome screening for susceptibility genes in multicase families with Behcet's disease. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;52(6):1836-42.

.26 Akman-Demir G, Tüzün E, İçöz S, Yeşilot N, Yentür SP, Kürtüncü M, et al. Interleukin-6 in neuro-Behcet's disease: association with disease subsets and long-term outcome. *Cytokine*. 2008;44(3):373-6.

.27 Chi W, Zhu X, Yang P, Liu X, Lin X, Zhou H, et al. Upregulated IL-23 and IL-17 in Behcet patients with active uveitis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(7):3058-64.

.28 Liu X, Yang P, Wang C, Li F, Kijlstra A. IFN- α blocks IL-17 production by peripheral blood mononuclear cells in Behcet's disease. *Rheumatology*. 2010;49:330.

.29 Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Yamada Y, Horie S, Mochizuki M. Inhibition of Th17 differentiation by anti-TNF- α therapy in uveitis patients with Behcet's disease. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(3):1.

.30 Imamura Y, Kurokawa M, Yoshikawa H, Nara K, Takada E, Masuda C, et al. Involvement of Th1 cells and heat shock protein 60 in the pathogenesis of intestinal Behcet's disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2005;141(2):139-45.

.31 Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*. 2009;5(6):325-31.

.32 Oztas M, Onder M, Gurer M, Bukan N, Sancak B. Serum interleukin 18 and tumour necrosis factor- α levels are increased in Behcet's disease. *Clinical and experimental dermatology*. 2005;30(1):61-3.

.33 Bonyadi M, Jahanafrooz Z, Esmaeili M, Kolahi S, Khabazi A, Ebrahimi AA, et al. TNF- α gene polymorphisms in Iranian Azeri Turkish patients with Behcet's Disease. *Rheumatology international*. 2009;29(2):285-9.

- .34 Ateş A, Kinikli G, Düzgün N, Duman M. Lack of association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with disease susceptibility and severity in Behcet's disease. *Rheumatology international*. 2006;26(4):348-53.
- .35 Khabbazi A, Rashtchizadeh N, Ghorbanihaghjo A, Hajialiloo M, Ghojzadeh M, Taei R, et al. The status of serum vitamin D in patients with active Behcet's disease compared with controls. *International journal of rheumatic diseases*. 2014;17(4):430-4.
- .36 Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *The Journal of Immunology*. 2009;183(9):5458-67.
- .37 O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*. 2012;36(4):542-50.
- .38 Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*. 2010;32(5):605-15.
- .39 Kim J, Park J, Lee E, Lee Y, Song Y, Lee E. Imbalance of Th 17 to Th1 cells in Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(4 Suppl 60):S16-9.
- .40 Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics*. 2005;14(suppl_1):R47-R58.
- .41 Safronova O, Morita I. Transcriptome remodeling in hypoxic inflammation. *Journal of dental research*. 2010;89(5):430-44.
- .42 Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(11):805-11.
- .43 Robertson KD. DNA methylation and chromatin-unraveling the tangled web. *Oncogene*. 2002;21(35):5361.
- .44 Sánchez-Pernaute O, Ospelt C, Neidhart M, Gay S. Epigenetic clues to rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2008;30(1):12-20.
- .45 Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circulation research*. 2008;102(8):873-87.
- .46 Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(10):692-703.
- .47 Trenkmann M, Brock M, Ospelt C, Gay S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2010;39(1):10-9.
- .48 King ON, Li XS, Sakurai M, Kawamura A, Rose NR, Ng SS, et al. Quantitative high-throughput screening identifies 8-hydroxyquinolines as cell-active histone demethylase inhibitors. *PloS one*. 2010;5(11):e15535.
- .49 Alipour S, Nouri M, Sakhinia E, Samadi N, Roshanravan N, Ghavami A, et al. Epigenetic alterations in chronic disease focusing on Behçet's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;91:526-33.
- .50 Mikeska T, Craig JM. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes*. 2014;5(3):821-64.
- .51 Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R, Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma . *Blood*. 2003;101(7):2784-8.

- .52 Hatirnaz O, Ure U, Ar C, Akyerli C, Soysal T, Ferhanoğlu B, et al. The SOCS-1 gene methylation in chronic myeloid leukemia patients. *American journal of hematology*. 2007;82(8):729-30.
- .53 Oshimo Y, Kuraoka K, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Chayama K, et al. Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. *International journal of cancer*. 2004;112(6):1003-9.
- .54 Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75.
- .55 Hatchwell E, Grealley JM. The potential role of epigenomic dysregulation in complex human disease. *TRENDS in Genetics*. 2007;23(11):588-95.
- .56 Jiang R, Jones MJ, Chen E, Neumann SM, Fraser HB, Miller GE, et al. Discordance of DNA Methylation Variance Between two Accessible Human Tissues. *Scientific reports*. 2015;5.
- .57 Yoshimura A, Suzuki M, Sakaguchi R, Hanada T, Yasukawa H. SOCS, inflammation, and autoimmunity. *Frontiers in immunology*. 2012;3.
- .58 Morikawa H, Ohkura N, VandenbonA, Itoh M, Nagao-Sato S, Kawaji H, et al. Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(14):5289-94.
- .59 Davey G, Heath W, Starr R. SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation. *HLA*. 2006;67(1):1-9.
- .60 Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T, Kimura A, et al. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;jem. 20110428.

SOCS1 Gene Methylation and Relative Expression Analysis in patients with Behcet Syndrome

Student: **ALI Abdi**

Supervisor: **Dr. Zohreh Babalo**

Department of immunology medicine faculty, Tabriz university of medical sciences.



Abstract:

Introduction: Epigenetic refers to inherited changes in mitosis and meiosis in the gene expression pattern which is independent of original DNA sequence. Since, SOCS1 hyper-methylation can activate JAK / STAT signaling pathway and activation of this pathway can directly affect the impact of different cytokines on cell function and subsequently lead to pathophysiology of diseases, in particular autoimmune diseases that interact directly with the amount of cytokines and due to the fact that the cause and pathology of Behcet's disease (beh-CHETS) have not ever been completely determined; the purpose of present study was to determine the methylation pattern of SOCS1 gene in patients with Behcet's disease and compare them with control group.

Methodology: This study was a case-control study in which 50 patients with Behcet's disease and 60 individuals as control group participated. Blood samples were collected from all participants. Then PBMC cells (Peripheral Blood Mononuclear Cells for Single Cell RNA Sequencing) were isolated through Ficoll method and methylation of considered sites was investigated using qMS-PCR technique after extraction of DNA by Saltaion out method and its analysis with Nano-drop.

Results: Findings about the amount of methylation and gene expression showed that the methylation level in patient group was increased in comparison with healthy subjects (control group) which the increase was statistically significant (p -value <0.05). Also, the results related to gene expression revealed that the mean gene expression in patient group was decreased in comparison with healthy subjects (control group) which the decrease was statistically significant (p -value <0.05).

Discussion and conclusion: According to the results of this disease, it can be guessed that DNA methylation may be involved in certain conditions of this disease and lead to regulation of expression of genes involved in pathogenesis of the disease.

Keywords: DNA methylation, Behcet's disease, SOCS1 gene, qMS-PCR



Tabriz University of Medical sciences

Faculty of Medicine

A Thesis submitted for MSc Degree in medical Immunology

**SOCS1 Gene Methylation and Relative Expression Analysis in
patients with Behcet Syndrome**

By:

Ali Abdi

Supervisors:

Dr. ZohrehBabaloo

Dr. EbrahimSakhinia

Advisor:

Dr. AlirezaKhabbazi

This work has been done in:

**Connective Tissue Diseases Research Center of Tabriz University of Medical
Sciences, Tabriz, Iran**

May 2018

Thesis No: 57363



Tabriz University of Medical sciences

Faculty of Medicine

A Thesis submitted for MSc Degree in medical Immunology

**SOCS1 Gene Methylation and Relative Expression Analysis in
patients with Behcet Syndrome**

By:

Ali Abdi

Supervisors:

Dr. ZohrehBabaloo

Dr. EbrahimSakhinia

Advisor:

Dr. AlirezaKhabbazi

This work has been done in:

**Connective Tissue Diseases Research Center of Tabriz University of Medical
Sciences, Tabriz, Iran**

May 2018

Thesis No: 57363