Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

بررسی میزان بیان ژن آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ و متابولیت آن (S-HETE-۱۵) در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و ارتباط آن با پروفایل لیپیدی سرم

بنفشه صفی زاده: کارشناسی ارشد گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران. bsafizadeh@yahoo.com
ریحانه هوشیار: دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران. reyhaneh.houshyar@gmail.com
مسعود مهرپور: متخصص مغز و اعصاب گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. mehrpr@yahoo.com
بیتا بیجاری: دکتری تخصصی، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران. bitabijari@bums.ac.ir
علیرضا شیخی: کارشناسی ارشد گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. alireza.sheikhi71@yahoo.com
***معصومه توکلی یرکی:** دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). masoumeh.tavakoli@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس از شایع‌ترین بیماری‌های التهابی خودایمن در سنین جوانی است که بسیاری از جوانب این بیماری هنوز ناشناخته است. هدف مطالعه حاضر بررسی بیان و فعالیت آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز (تولید کننده محصولات پراکسیدی لیپیدی و تنظیم کننده التهاب و واکنش‌های ایمنی) در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به مالیپل اسکلروزیس و افراد سالم و بررسی ارتباط آن با پروفایل لیپیدی افراد است.

روش‌کار: در این مطالعه موردی – شاهدی، ۳۰ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مراجعه کننده به بیمارستان فیروزگر تهران و ۲۳ نفر سالم به عنوان گروه کنترل شرکت داشتند. از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد جهت استخراج mRNA و ساخت cDNA استفاده شد و جهت تعیین میزان بیان ژن از روش Real Time PCR بر پایه سایبرگرین استفاده شد. آنالیز نتایج با استفاده از متد ΔΔCT بررسی گردید. همچنین میزان متابولیت آنزیمی ۱۵ -لیپواکسیژناز (15-S-HETE) در سرم افراد توسط تکنیک‌های کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (High Pressure Liquid Chromatography-HPLC) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت آنالیز آماری به وسیله نسخه ۵ نرم افزار Graph Pad Prism و تست آماری T-Test استفاده گردید.

یافته‌ها: بررسی میزان بیان ژن ۱۵ لیپواکسیژناز – ۱ در سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از خون محیطی افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و افراد سالم نشان داد که میزان بیان این ژن در نمونه‌های بیمار افزایش معنی‌داری را در مقایسه با افراد سالم نشان می‌دهد. همچنین میزان فعالیت آنزیم ۱۵ لیپواکسیژناز – ۱ که از طریق اندازه‌گیری میزان متابولیت آن در سرم بیماران و افراد سالم بررسی گردیده است نشان داد که فعالیت آنریم در سرم بیماران بیشتر از افراد سالم است ($p<۰/۰۵$). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس که سطح کلسترول، تری گلیسیرید و LDL بالاتر از محدوده نرمال دارند، میزان بیان آنزیم ۱۵ لیپواکسیژناز – ۱ و متابولیت آن (15-S-HETE) افزایش معنی‌داری را نسبت به افراد بیمار با پروفیل لیپیدی نرمال نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که مسیر آنزیمی ۱۵ لیپواکسیژناز – ۱ ممکن است در بیماری زایی مالتیپل اسکروزیس موثر باشد و با توجه به اختلاف معنی‌دار سطح آنزیم فوق در نمونه‌های بیماران و افراد سالم می‌تواند به عنوان مسیر احتمالی موثر در کنترل بیماری مورد توجه و بررسی بیشتر قرار گیرد. از آنجا که افزایش سطح پروفیل لیپیدی از علل خطر و تاثیر گذار در بیماریزایی مالتیپل اسکروزیس است در این مطالعه نیز ارتباط مستقیمی بین سطح وفعالیت بیشتر آنزیم در بیماران با سطح کلسترول، تری گلیسیرید و LDL بالاتر مشاهده گردید که به نقش مهم مسیرهای مرتبط با متابولیسم چربی در مالتیپل اسکروزیس تاکید دارد.

کلیدواژه‌ها: التهاب، HPLC، بیان ژن، آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز، مالتیپل اسکلروزیس

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های اتوایمن در سنین جوانی است که با میلین‌زدایی، آسیب آکسونی و دژنره شدن نورونی همراه است (۱). این بیماری دارای توزیع ناهمگنی در میان کشورها است و شیوع آن با عرض جغرافیایی شمال یا جنوب خط استوا افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که نزدیک به ۴۰۰ هزار

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

نفر از مردم آمریکا و ۲/۵ میلیون نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا می‌باشند. شیوع مالتیپل اسکلروزیس در طی قرن گذشته به‌طور پیوسته افزایش داشته و این افزایش عمدتاً در خانم‌ها دیده شده است (۲و ۳) . اطلاعات کنونی بیان می‌دارند که مالتیپل اسکلروزیس بیماری پیچیده‌ای است و مجموع عوامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد آن اثرگذارند (۴). لیپواکسیژنازها (Lipoxygenase) خانواده‌ای از آنزیم‌های دی اکسیژناز دارای آهن (غیر همی) می‌باشند که قادر هستند ملکول اکسیژن را به داخل اسیدهای چرب آزاد یا استری غیراشباع (PUFA) وارد نموده و متابولیت‌های فعال هیدروپراکسی را تولید نمایند. بر اساس قابلیت وارد کردن اکسیژن در ناحیه خاصی از زنجیره اسید چرب به انواع لیپواکسیژنازهای نوع ۵، ۸، ۱۲ و ۱۵ تقسیم می‌شوند. از بین اعضای این خانواده ۱۵-لیپواکسیژنازها که موضوع این تحقیق می‌باشند، به دو زیر خانواده ۱۵- لیپواکسیژناز نوع ۱و نوع ۲ تقسیم شده و هر دو آنزیم با اکسیداسیون آراشیدونیک اسید، 15-S-HETE تولید می‌کنند اما فقط آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز نوع ۱ است که با اکسیداسیون لینولئیک اسید ترکیب 13-S-HODE را تولید می‌کند. این آنزیم‌ها در سلول‌های مختلفی ازجمله گلبول‌های قرمز، ائوزینوفیل‌ها، سلول‌های اپی تلیال مجاری هوایی، لکوسیت‌های چندهسته‌ای، ماکروفاژهای مجاری هوایی، سلول‌های اندوتلیال عروقی،آدیپوسیت‌ها و سیستم تولیدمثلی مردانه و زنانه بیان می‌شوند. عموماً لیپواکسیژنازها ترجیح می‌دهند از اسیدهای چرب آزاد به‌عنوان سوبسترا استفاده نمایند اما می‌توانند به اسید چرب استری شده در فسفولیپیدهای غشا و اسیدهای چرب موجود در کلسترول استرها اثر گذاشته و ایکوزانوئیدهای استر مانند (فسفاتیدیل کولین / فسفایدیل اتانول آمین–HETE) تولید کنند که در پاک‌سازی التهاب نقش دارند(۵و ۶). واسطه‌های لیپیدی لیپواکسیژنازها شامل لکوترین‌ها، لیپوکسین‌ها و فرم‌های مختلف محصولات اکسیدی فسفولیپیدها نقش مهمی در فرآیندهای ضد التهابی، تنظیم کننده فاگوسیتوز و اتوفاژی ایفا می‌کنند (۱۰-۶). تا سال ۱۹۹۰ اکثر شواهد نشان‌دهنده عملکرد پیش التهابی محصولات آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز بود اما مطالعات بعدی شواهدی از فعالیت‌های ضد التهابی محصولات لیپواکسیژناز ها را ارایه نمود (۸). محصولات آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز شامل 15-S-HETE، 13-S-HODE، لیپوکسین ها و فسفولیپیدهای اکسید شده اثرات ضد التهابی خود را توسط گیرنده‌های هسته‌ای و سطح غشا اعمال می‌کنند. همچنین بسیاری از متابولیت‌های آن‌ها باعث فراخوانی مونوسیت ها و ماکروفاژها شده که در پاک‌سازی اجساد سلول‌های آپاپتوزی نقش دارند (۱۱). در طی التهاب فعالیت ۱۵-لیپواکسیژناز ممکن است تغییر کند و با تولید محصولات اکسید شده لیپیدی شامل کلسترول استر اکسید شده و 12-HETE عملکرد پیش التهابی داشته باشد. بسته به نوع سلول و بافت و همچنین تغییرات رژیم غذایی طیف وسیعی از سوبسترا ها ممکن است تولید شود (۱۰و ۱۲).

اگرچه بسیاری از مطالعات بیان می‌کنند که آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز در پاتوزنز بیماری‌های التهابی، متابولیک و ویروسی نقش دارد اما هنوز بسیاری از جنبه‌های فعالیت این آنزیم به‌خصوص در بیماری‌های نورولوژیکی مانند بیماری مالتیپل اسکلروزیس ناشناخته است. مطالعه متسون و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داد سطح دو متابولیت PGE2 و 15-S-HETE در CSF بیماران مالتیپل اسکلروزیس نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است و همین طور پراس و همکارانش در مطالعه خود در سال ۲۰۱۳، واسطه‌های لیپیدی را در بیماران مالتیپل اسکلروزیس اندازه‌گیری کردند و نتیجه گرفتند ۱۵ S-HETE-و PGE2 که به ترتیب محصولات آنزیم‌های لیپواکسیژناز و سیکلواکسیژناز هستند در CSF بیماران افزایش یافته است(۷و ۱۳). آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز در فوم سل‌های موجود در پلاک‌های آترواسکلروزی بیان می‌شود و در اکسیداسیون ذرات LDL و تولید محصولات لیپیدی-التهابی و ایجاد التهاب عروقی و پلاک آترواسکلروزی نقش مهمی دارد (۱۲). پراکسیداسیون لیپیدی توسط آنزیم ۱۵-

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

لیپواکسیژناز باعث القای استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال آزاد شده که در پاتوزنز بیماری مالتیپل اسکلروزیس نقش مهمی دارد. رادیکال آزاد اکسیژن و نیتروژن باعث ایجاد التهاب، شکسته شدن سد خونی- مغزی، دژنره شدن میلین و الیگودندروسیت ها و اختلال در هدایت پیام آکسونی می‌شود (۱۴و ۱۵). اخیراً مسیر ۱۵- لیپواکسیژناز به‌عنوان یک مکانیسم مولکولی جدید مؤثر در التهاب موردتوجه قرار گرفته است. اطلاعات بسیار ناچیزی از نقش آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز در پاتوژنز بیماری‌های التهابی در دست است. به دلیل حساسیت و اهمیت بیماری مالتیپل اسکلروزیس ،لزوم پی بردن به علل وقوع این بیماری ونیز پیداکردن ملکول هدف مناسب جهت کنترل بیماری، ذهن بسیاری ازگروهای تحقیقاتی معطوف این بیماری شده است . براین اساس در تحقیق حاضر نقش آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و افراد سالم و ارتباط آن با سطح سرمی تری گلیسیرید و کلسترول و LDL بیماران مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌کار

نمونه‌گیری: در این مطالعه موردی – شاهدی، ۳۰ فرد بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس (از نوع RRMS) مراجعه کننده به بیمارستان فیروزگر تهران و ۲۳ فرد سالم به عنوان گروه کنترل شرکت داشتند. بیماری افراد مورد مطالعه براساس شواهد کلینیکی و پاراکلینیکی (MRI، پتانسیل های فراخوانده) توسط متخصص مغز و اعصاب تایید شد. بیماران و افراد کنترل از نظر سن و جنس مطابقت داشتند (جدول ۱). میزان ناتوانی بیماران با استفاده از مقیاس EDSS ارزیابی شد (۱۶) و بیماران با EDSS بالای ۶ از مطالعه حذف شدند. از هر دو گروه بیمار و کنترل رضایت نامه در خصوص استفاده از نتایج آن‌ها در این پژوهش به صورت کتبی دریافت شد. ۱۰ میلی لیتر خون از بیماران و افراد سالم نمونه گیری شد و در ویال‌های زرد رنگ (فاقد ماده ضد انعقاد) به منظور جداسازی سرم و در ویال سبز رنگ (دارای ماده ضد انعقاد) به منظور جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تقسیم شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از خون تام: نمونه‌های خون هپارینه ضمن رقیق سازی به نسبت یک به یک با PBS، باپیپت پاستور به آرامی به ۳ میلی لیتر محلول فایکول اضافه گردید به‌طوریکه با فایکول مخلوط نگردد. پس از سانتریفوژ، لایه سلول‌های تک هسته‌ای، مابین لایه فایکول و پلاسما، به آرامی توسط پیپت جمع آوری گردید. نمونه حاصل پس از شستشو با محلول PBS، برای انجام مراحل بعدی در منفی ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

استخراج RNA از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و سنتز cDNA: برای داشتن داده های مناسب در Real-time PCR نیازمند استخراج RNA با کیفیت و غلظت مناسب هستیم. RNA سلولی با استفاده از محلول Trizol استخراج گردید. ابتدا به میکروتیوب حاوی سلول‌های تک هسته‌ای به میزان ۶۰۰ میکرولیتر از Trizol سرد اضافه و به مدت ۵ دقیقه با دور g۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. سپس به میزان ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم سرد اضافه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی یخ انکوبه و پس از آن با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول رویی حاوی RNA جدا گردید. سپس به میزان هم حجم از فاز شفاف بالایی حاوی RNA، محلول ایزوپروپانول به میکروتیوپ اضافه گردید. پس از ۵۰ بار سر ته شدن آرام، در شرایط سرد یخچال به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد و برای ۱۵ دقیقه در g۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. RNA به شکل ژله ای در انتهای لوله شکل می‌گیرد. محلول رویی خارج شده و به رسوب RNA یک میلی لیتر اتانول ۷۵٪ (که با آب دیونیزه با DEPC تهیه گردیده بود) اضافه شده و سانتریفوژ در ۸۰۰۰ دور به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت. مایع رویی دور ریخته شد در نهایت میکروتیوپ ها در محیط قرار داده شدند تا اتانول موجود در آن‌ها تبخیر شود سپس رسوب RNA

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

در کف هر میکروتیوپ با ۳۰ میکرولیتر از آب فاقد RNase حل شد و در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. بررسی کمی RNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ انجام شد. برای ساخت cDNA از کیت ((Takara,Japan)) استفاده گردید. واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل حجم محاسبه شده از RNA با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم و آب فاقد RNase، ۲ میکرولیتر از بافر PrimeScript 5X، ۰/۵ میکرولیتر از RT Enzyme، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر الیگو و ۰/۵ میکرولیتر راندم هگزامر انجام شد. سپس میکروتیوپ ها در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad's thermal cyclers) با توجه به برنامه (۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه، ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴ درجه سانتی گراد) قرار داده شدند. بعد از اتمام مراحل، cDNA سنتز شده برای ادامه آزمایش ها در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

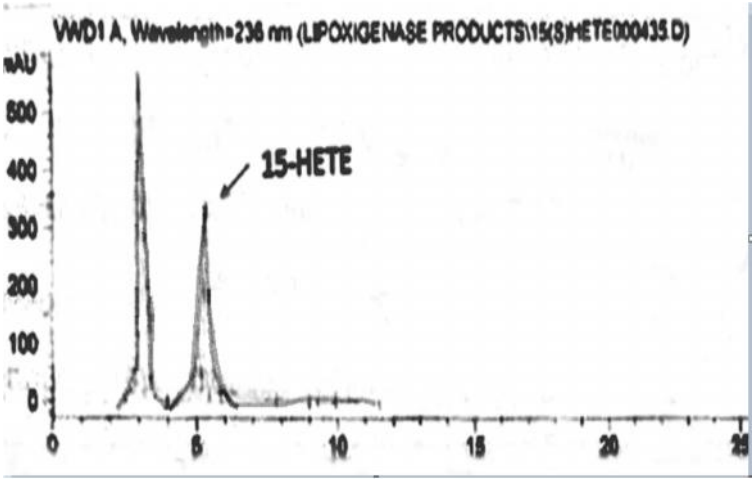
ارزیابی بیان ژن توسط Real Time PCR: پرایمر ژن های ۱۵- لیپواکسیژناز -۱ و بتا اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی با استفاده از سایت NCBI و نرم افزار آنلاین Primer3 web طراحی و سنتز گردیدند توالی پرایمر های Forward و Reverse ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ به ترتیب -'5 GGC AAG GAG ACA GAA CTC AA-3' (Tm:۵۸) و 5' –CAC AGA GAT CCA GTT GCA GA -3' (Tm:۵۸) می‌باشند. توالی پرایمر های Forward و Reverse ژن بتا اکتین به ترتیب 5'-TGG GCA TCC ACG AAA CTA C- 3' (Tm:۵۷) و 5-GAT CTC CTT CTG CAT CCT GT 3' (Tm:۵۷) می‌باشند.

برای انجام Real-time PCR از مسترمیکس مخصوص (SYBR green Rox plus) ساخت شرکت (Takara,Japan) و دستگاه Applied Biosystem 7500 استفاده گردید. تکثیر DNA ژن مورد نظر بر اساس پروفایل دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه برای جداشدن دو رشته DNA، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای هیبرید شدن پرایمرها به ژن ها و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای پیشروی آنزیم پلی مراز در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری بیان ژن های مورد مطالعه: در این مطالعه برای سنجش سطح بیان ژن آنزیم ۱۵ لیپواکسیژناز- ۱ در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس از تکنیک Real Time PCR quantitative و متد $2^{-\Delta\Delta ct}$ برای آنالیز داده ها استفاده گردید و میانگین بیان ژن β-Actin به عنوان کنترل داخلی جهت نرمال سازی میزان بیان ژن ها در نظر گرفته شد. میزان بیان ژن 15-LOX-1 با روش کمی نسبی ارزیابی گردید. میزان تکثیر در چرخه‌ای که بیان ژن‌ها قابل ردیابی بود تحت عنوان (Threshold Cycle Ct) نامیده می‌شود. پس از به دست آوردن Ct ژن های مورد مطالعه در تمامی نمونه ها و محاسبه ΔCT (حاصل تفریق CT ژن های مورد بررسی از CT ژن بتا اکتین) برای تمام نمونه های بیماران و افراد سالم $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه شد که به آن سطح بیان نسبی ژن (Relative Expression) می گویند. سپس Fold Change تمام نمونه ها نسبت به میانگین سطح بیان نسبی نمونه های کنترل محاسبه گردید و با استفاده نرم افزار San Diego, GraphPad Prism (California, USA) و به کاربردن آزمون t-test داده‌ها مورد آنالیز قرار گرفتند. حدود اطمینان ۹۵٪ بوده و از نظر آماری اختلاف میانگین $p<0.05$ به منزله معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

سنجش متابولیت آنزیم ۱۵ –لیپواکسیژناز (15-HETE) با روش HPLC: محصول آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ یا 15-S-HETE یک ایکوزانوئید اندوژن است که در سلول‌های متنوعی تولید می‌شود این متابولیت عمر کمی در سلول دارد و سریعا متابولیزه می گردد. تولید و فعالیت این متابولیت به نوع سلول و بافت بستگی دارد. سنجش 15-S-HETE با استفاده از دستگاه HPLC مدل شرکت (Cecil instrument LTD Uk) و دتکتور نوری (UV-Visible) انجام گرفت. ستون C18 با ابعاد (4.6× 250 میلی متر) استفاده شد و فاز متحرک شامل حاوی مخلوط متجانس حجمی ۰,۱:۵۰:۵۰ از متانول، آب خالص و اسید استیک گلاسیال (حجمی / حجمی) بوده که با

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018



شکل ۱- نمونه ای از منحنی کروماتوگرام HPLC در طول موج ۲۳۶ نانومتر که نشان می دهد ترکیب 15-S-HETE با زمان تاخیر ۵ دقیقه از ستون خارج شده است.

سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه از ستون عبور می‌کند. محلول استاندارد 15-S-HETE (استوک) در اتانول با غلظت ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر تهیه شد و به صورت سریال رقیق شده تا غلظت‌های ۵،۱۰،۱۵،۲۰،۲۵، ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شدند. استاندارد اولیه ۵۰ میکروگرم در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد و محلول‌های استوک ۵ یا ۱۰ میکروگرم در فریزر معمولی نگهداری گردیدند. با استفاده از ستون فاز معکوس C18 زمان تاخیر خروج متابولیت 15-S-HETE از ستون ۵ دقیقه بوده که با استفاده از بررسی منحنی جذب نوری در طول موج ۲۳۶ نانومتر قابل شناسایی بود. برای بررسی میزان 15-S-HETE در نمونه های بیماران حجم ۵۰ میکرولیتر از پلاسمای بیماران در دستگاه تزریق گردید. نمونه ای از منحنی کروماتوگرام حاصل از تزریق استاندارد 15-S-HETE در دستگاه در شکل ۱ نشان داده شده است.

سنجش سطح کلسترول و تری گلیسیرید و LDL: سنجش سطح کلسترول و تری گلیسرید بر روی سرم بیماران با استفاده از کیت اندازه‌گیری کلسترول (CHOD-PAP) و کیت اندازه‌گیری تری گلیسرید (GPO-PAP) شرکت پیشتاز طب بر مبنای پروتوکل کیت و بر اساس کالریمتری، آنزیمی و اندازه‌گیری End Point با روش فتومتریک انجام گرفت. بررسی سطح سرمی LDL با استفاده از کیت تعیین غلظت LDL به روش مستقیم (پیشتاز طب) و طبق دستورالعمل کیت اندازه‌گیری شد. اساس این روش بر مبنای ویژگی فیزیکی و شیمیایی متفاوت لیپوپروتئین با دترجانت ها است و خوانش جذب در ۵۴۶ نانومتر انجام گرفت.

یافته‌ها

اطلاعات دموگرافیک: این پژوهش بر روی ۳۰ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس با میانگین سنی ۳۵,۴ با انحراف معیار ۷/۵ سال و ۲۳ فرد سالم با میانگین سنی ۳۵/۳ با انحراف معیار ۷/۲۴ سال انجام گرفت. اکثر بیماران در مرحله ابتدایی ابتلا به بیماری بودند. ۸۰٪ از بیماران و ۷۵٪ از افراد کنترل در رده سنی ۲۰-۴۰ سال قرار داشتند و ۷۰٪ از افراد بیمار و ۷۳٪ از افراد کنترل را زنان تشکیل دادند. در توزیع فراوانی جنس و سن در افراد دو گروه بیمار و کنترل تفاوت معناداری وجود نداشت (p=0.66). ۳۳٪ از بیماران دارای بیماری از نوع پیشرونده (EDSS ≥3.5) و ۶۷٪ از بیماران بیماری از نوع عود کننده- بهبود یابنده (EDSS≤3.5) داشتند. اطلاعات دموگرافیک بیماران در جدول ۱ خلاصه شده است. بر اساس نتایج آزمایشگاهی بیماران، یک سوم از مبتلایان به مالتیپل اسکلروزیس دارای سطح کلسترول و تری گلیسیرید بالاتر از حد نرمال بودند. همچنین ۵۰٪ از بیماران دارای سطح LDL بالا و ۱۰٪ از بیماران نیز دارای سطح HDL پایین بودند.

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

جدول ۱- توزیع فروانی مشخصات دموگرافیک بیماران و افراد کنترل مورد مطالعه

	تعداد	میانگین سن	EDSS	دوره بیماری	ام اس (نوع)	زنان
بیماران	۳۰	۳۵,۴	۴,۱۹(۰-۱۰)	۹ (۰-۱۰)	پیشرونده (۳۳٪) عود کننده – بهبود یابنده (۶۷٪)	۷۰٪
افراد سالم	۲۳	۳۵,۳	-	-	-	۷۳٪

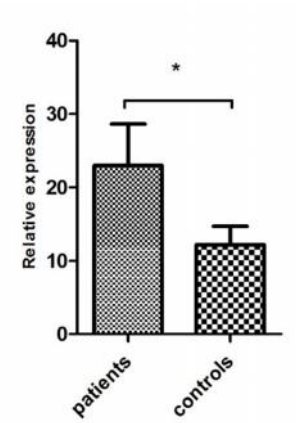
جدول ۲- پروفایل لیپیدی بیماران مالتیپل اسکلروزیس

پارامترها	محدوده نرمال	تعداد (%)
کلسترول (mg/dl)	محدوده نرمال :۲۰۰≤	۲۰(۶۷٪)
	بالا : ۲۴۰≤	۱۰(۳۳٪)
تری گلیسیرید (mg/dl)	محدوده نرمال :۱۵۰≤	۲۱(۷۰٪)
	بالا ۲۰۰≤:	۹(۳۰٪)
LDL (mg/dl)	محدوده نرمال :۱۰۰≤	۱۵(۵۰٪)
	بالا ۱۹۰≤:	۱۵(۵۰٪)
HDL (mg/dl)	محدوده نرمال : ۴۰-۵۰	۲۷(۹۰٪)
	پایین ۴۰≤:	۳(۱۰٪)

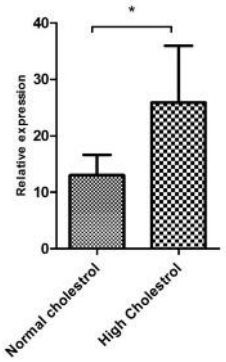
اطلاعات آزمایشگاهی بیماران در جدول ۲ خلاصه شده است.

نتایج ارزیابی بیان ژن ۱۵- لیپواکسیژناز-۱ در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و افراد کنترل سالم: میزان نسخه های mRNA ژن ۱۵- لیپواکسیژناز-۱ در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس نسبت به گروه سالم ارزیابی شد. نتایج نشان داد میزان بیان ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس، نسبت به افراد سالم افزایش داشته است (نمودار ۱-الف) و این تفاوت از نظر آماری معنی دار است ($p<0.05$). همچنین مشاهده شد در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس با سطح کلسترول، تری گلیسیرید و LDL بالا میزان بیان ژن ۱۵- لیپواکسیژناز-۱ بیشتر از افرادی با سطح پروفایل لیپیدی نرمال بوده است که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بوده است (نمودار ۱-ب، ج، د) ($p<0.05$).

نتایج ارزیابی سطح در گردش 15-S- HETE در سرم بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و افراد سالم: همچنین نتایج بررسی میزان سطح سرمی 15-S- HETEدر بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و افراد سالم نشان می دهد که در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مقدار 15-S- HETE بیشتر از افراد سالم است (نمودار ۲-الف) که این اختلاف از نظر آماری معنی دار است.

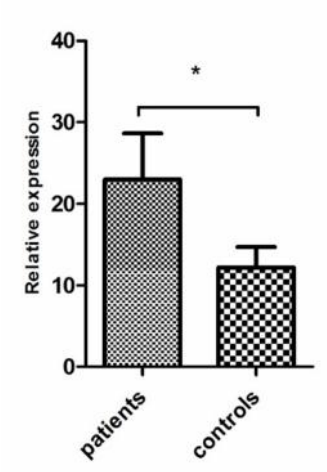


نمودار ۱-الف: میزان بیان ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ در سلول های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس نسبت به گروه سالم

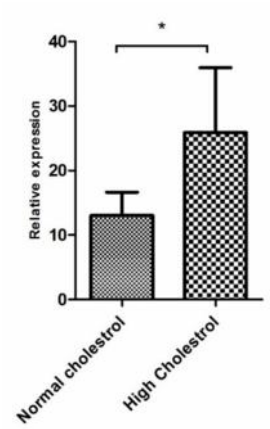


نمودار ۱-ب: -میزان بیان ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس با سطح کلسترول بالا و نرمال

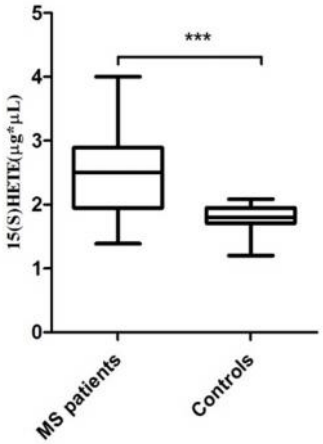
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018



نمودار۱-الف: میزان بیان ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ در سلول های تک هسته ای خون محیطی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس نسبت به گروه سالم

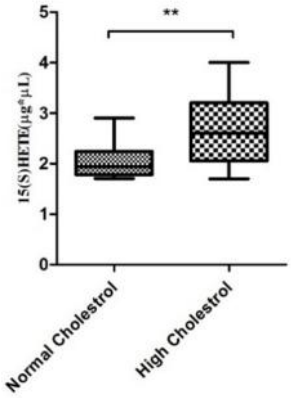


نمودار ۱-ب: -میزان بیان ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس با سطح کلسترول بالا و نرمال

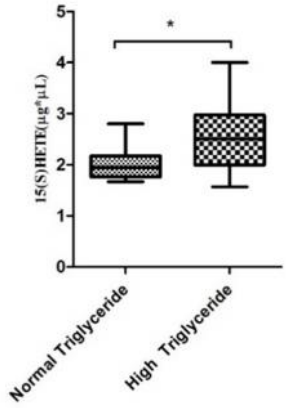


نمودار ۲- الف- میزان سطح سرمی 15-S- HETE در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و افراد کنترل سالم

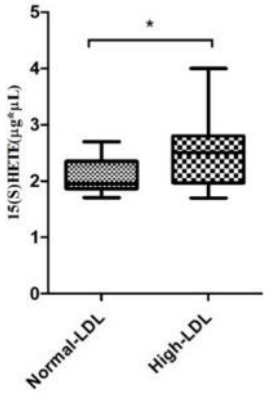
همچنین مشاهده شد در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس با سطح کلسترول، تری گلیسیرید و LDL بالا میزان سطح سرمی 15-S- HETE



نمودار۲ب- میزان سطح سرمی 15-S- HETE در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس سطح کلسترول بالا و نرمال



نمودار۲ج- میزان سطح سرمی 15-S- HETE در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس از با سطح تری گلیسیرید بالا و نرمال



نمودار۲د -میزان سطح سرمی 15-S- HETE در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس با سطح LDL بالا و نرمال

بیشتر از افرادی با سطح نرمال از پروفایل لیپیدی فوق است (نمودار ۲-ب، ج، د) که این اختلاف از نظر آماری معنی دار است ($p<0.05$).

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

بحث و نتیجه‌گیری

در بیماری‌های حاد و مزمن سیتم عصبی سایتوکاین های التهابی، پروستاگلاندین ها و لکوترین ها نقش مهمی ایفا می‌کنند. لیپواکسیژنازها نقش مهمی در تنظیم پاسخ های التهابی دارند و به عنوان اهداف درمانی ضد التهابی برای بیماری‌های CNS مورد استفاده قرار می گیرند (۱۷). التهاب در تمام مراحل فاز بیماری مالتیپل اسکلروزیس وجود دارد اما بیشتر در فاز عود کننده و حاد دیده می‌شود. در مراحل اولیه التهاب مالتیپل اسکلروزیس، نشت سد خونی مغز باعث ورود سلول‌های التهابی به CNS از گردش خون می‌شود. در بیماران فاز پیشرونده مالتیپل اسکلروزیس سلول‌های ایمنی ازجمله پلاسماسل ها وسلول‌های B نیز حضور دارند (۱۸). متابولیت‌های ضد التهابی مشتق از ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ از قبیل لیپوکسین، پروتکتین و ریزالوین اثرات ضدالتهابی بر روی انواع سلول ها دارند (۸)؛ بنابراین ارزیابی بیان و فعالیت آنزیم ۱۵- لیپواکسیژناز-۱ در بیماری مالتیپل اسکلروزیس که یک بیماری مزمن التهابی و اتوایمن است می تواند حائز اهمیت باشد. در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مبتلایان به بیماری مالتیپل اسکلروزیس و افراد کنترل سالم و سطح متابولیت 15-S- HETE در سرم بیماران و افراد سالم ارزیابی شد و نتایج نشان داد میزان بیان ژن و سطح سرمی متابولیت آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است که از نظر آماری معنی دار است. مطالعه حاضر اولین مطالعه بررسی سطح آنزیم فوق در سطح mRNA و متابولیت 15-S- HETE در سرم بیماران مبتلا به مالیپل اسکلروزیس است که از این جهت نتایج مطالعه حاضر می تواند دریچه ای به سمت نقش احتمالی این مسیر آنزیمی در پاتوژنز بیماری مالتیپل اسکلروزیس باز کند.

مطالعه متسون و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داد سطح دو متابولیت PGE2 و 15-S-HETE در CSF بیماران مالیپل اسکلروزیس و گروه کنترل افزایش داشته است (۷) و همین طور پراس و همکارانش درمطالعه ای در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که واسطه‌های لیپیدی ازجمله 15-S-HETE و PGE2 که به ترتیب محصولات آنزیم‌های لیپواکسیژناز و سیکلواکسیژناز هستند در CSF بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس افزایش یافته است و متابولیت 15-S-HETE می تواند با مهار سلول‌های Th1 و کاهش ترشح سایتوکاین های التهابی به عنوان مارکر ضد التهاب در بیماران مالتیپل اسکلروزیس مطرح شود (۱۳). در همین راستا نتایج مطالعه حاضر همزمانی افزایش بیان ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ و متابولیت آن را در بیماران فوق نشان می دهد که بر اهمیت مسیر لیپواکسیژناز تاکید می‌کند. همچنین نشان داده شده است که ترکیب 15-S-HETE از طریق گیرنده‌های مختلف مانند GPR31 و PPARγ اثرات ضد التهابی خود را ایفا می‌کند (۱۹و ۲۰). آنزیم ۱۵/۱۲ لیپواکسیژناز و متابولیت‌های آن نقش مهمی در تولید و یا حفاظت التهاب دارند. اثرات پیش آترواسکلروزی ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ باعث اکسیداسیون LDL و عود دیواره عروقی می‌شود و هم چنین تولید سایتوکاین های پیش التهابی بعلت لانه گزینی سلول ها در دیواره عروقی افزایش می‌یابد (۲۱). کلسترول LDL توسط آنزیم ۱۵ لیپواکسیژناز-۱ به LDL اکسید شده تبدیل شده که قادر به القای پاسخ های پیش التهابی از قبیل استرس اکسیداتیو و بیان مولکول چسبان در سیستم ایمنی می باشد، بیان ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ در سلول‌های اندوتلیال به‌طور معنی داری بالاست (۲۲). بر این اساس در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس که سطح سرمی کلسترول تام و LDL کلسترول آن‌ها بالاست فرآیندهای التهابی در این بیماران افزایش می‌یابد نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در بیماران با پروفایل لیپیدی بالاتر از سطح نرمال، میزان بیان و فعالیت آنزیم ۱۵ لیپواکسیژناز-۱ بالاتر است. استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال آزاد شده ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی توسط آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز می تواند در پاتوزنز بیماری مالتیپل اسکلروزیس مؤثر باشد و زمینه ساز التهاب، شکسته شدن سد خونی-

مغزی، دژنره شدن میلین و الیگودندروسیت ها و اختلال در هدایت پیام آکسونی شود. بر مبنای نتایج مطالعه حاضر در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس با سطح تری گلیسیرید بالا، بیان ژن ۱۵ لیپواکسیژناز-۱ نسبت به افرادی با سطح نرمال تری گلیسیرید افزایش یافته است که از نظر آماری معنی دار است ($p<0.05$) که یافته فوق می تواند نشان‌دهنده افزایش فعالیت این آنزیم از نظر دسترسی به سوبستراهای خود ازجمله آراشیدونیک اسید و لینولئیک اسید باشد.

از طرفی بر اساس مطالعات و شواهد قبلی ثابت شده است که ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ از نظر بیان و عملکرد کاملاً به صورت Tissue-Specific یعنی وابسته به بافت عمل می‌کند به‌طوری‌که در زمینه سرطان نیز در برخی بافت ها به نفع ایجاد التهاب و سرطان و در برخی بافت ها به ضرر ایجاد بیماری است. در مطالعه حاضر افزایش همزمان قابل توجهی در میزان بیان ژن ۱۵-لیپواکسیژناز-۱ و متابولیت آن در نمونه های بیمار نسبت به کنترل مشاهده گردید که نشان می دهد آنزیم فوق در بیماری مالتیپل اسکلروزیس که بیماری التهابی است به نفع ایجاد التهاب و وخامت بیماری است و با پروفایل لیپیدی بیماران ارتباط معنی داری دارد. نتایج مطالعه حاضر اولین شواهد را در خصوص اهمیت مسیر ۱۵ لیپواکسیژناز-۱ در بیماری مالتیپل اسکلروزیس فراهم نمود که می تواند پایه ای برای مطالعات مکانیسمی گسترده تر در زمینه پاتوژنز این بیماری باشد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران با شماره طرح 27351-30-05-94 در دانشگاه علوم پزشکی ایران به ثبت رسیده است و هزینه های طرح توسط دانشگاه تامین گردید.

منابع

1. Fauci A, Kasper D, Longo D. Harrison's Principles of Internal Medicine. Vol 1. 2008.
2. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. Autoimmun Rev; 2010.9(5):A387-A94.
3. Etemadifar M, Sajjadi S, Nasr Z, Firoozeei TS, Abtahi S-H, Akbari M, et al. Epidemiology of multiple sclerosis in Iran: a systematic review. Eur Neurol; 2013.70(5-6):356-63.
4. Pugliatti M, Harbo HF, Holmøy T, Kampman MT, Myhr KM, Riise T, et al. Environmental risk factors in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand Suppl; 2008.117(s188):34-40.
5. Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance.Biochim Biophys Acta; 2015. 1851(4): 308-30.
6. Mashima R, Okuyama T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. Redox Biol; 2015.6:297-310.
7. Mattsson N, Yaong M, Rosengren L, Blennow K, Mansson JE, Andersen O, et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of prostaglandin E2 and 15-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in multiple sclerosis. J Intern Med; 2009.265(4):459-64.
8. Ackermann JA, Hofheinz K, Zaiss MM, Krönke G. The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity. Biochim Biophys Acta; 2017.1862(4):371-81.
9. Kühn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. Prog Lipid Res; 2006.45(4):334-56.
10. Uderhardt S, Krönke G. 12/15-lipoxygenase during the regulation of inflammation, immunity, and self-tolerance. J Mol Med (Berl) J; 2012.90(11):1247-56.
11. Ziboh VA. The significance of polyunsaturated fatty acids in cutaneous biology. Lipids; 1996.31(1):S249-S53.
12. Rothe T, Gruber F, Uderhardt S, Ipseiz N, Rössner S, Oskolkova O, et al. 12/15-lipoxygenase–mediated enzymatic lipid oxidation regulates DC maturation and function. J Clin Invest; 2015.125(5):1944-54.
13. Prüss H, Rosche B, Sullivan AB, Brommer B, Wengert O, Gronert K, et al. Proresolution lipid mediators in multiple sclerosis—differential, disease severity-dependent synthesis—a clinical pilot trial. PLoS One; 2013.8(2):e55859.
14. Conrad DJ. The arachidonate 12/15 lipoxygenases. Clin Rev Allergy Immunol; 1999.17(1-2):71-89.
15. Oliveira SR, Kallaur AP, Simão ANC, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. J Neurol Sci; 2012.321(1):49-53.
16. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis an expanded disability status scale (EDSS). Neurology; 1983.33(11):1444.
17. Eleftheriadis N, Poelman H, Leus NG, Honrath B, Neochoritis CG, Dolga A, et al. Design of a novel thiophene inhibitor of 15-lipoxygenase-1 with

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

both anti-inflammatory and neuroprotective properties. Eur J Med Chem; 2016.122:786-801.
18. Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD , Pluchino S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. Prog Neurobiol; 2015.127:1-22.
19. Guo JL, Lee VM-Y. Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. J Biol Chem.Journal abbreviation; 2011.286(17):15317-31.
20. Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. Nature; 1999.400(6742):378.
21. Katalin S, Rubakhin SS, Szücs A, Hughes TK, Stefano GB. Opposite effects of interleukin-2 and interleukin-4 on GABA-induced inward currents of dialysed Lymnaea neurons. J Biol Chem; 1997.29(1):73-7.
22. Pirillo A, Reduzzi A, Ferri N, Kuhn H, Corsini A, Catapano AL. Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) by 15-lipoxygenase-modified LDL in endothelial cells. Atherosclerosis; 2011.214(2):331-7.

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 7:12 IRST on Tuesday January 23rd 2018

Evaluation of the gene expression level of 15-Lipoxygenase-1 and its metabolite (15-S-HETE) in patients with Multiple Sclerosis and its association with serum lipid profile

Banafsheh Safizadeh, MSC, Department of Biochemistry, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. bsafizadeh@yahoo.com
Reyhane Hoshyar, PhD, Cellular Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. reyhaneh.houshyar@gmail.com
Masoud Mehrpour, MD, Department of Neurology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. mehrpr@yahoo.com
Bita Bijari, PhD, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. bitabijari@bums.ac.ir
Alireza Sheikhi, MSc, Department of Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. alireza.sheikhi71@yahoo.com
*__Masoumeh Tavakoli-Yaraki__, PhD, Department of Biochemistry, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences. (*Corresponding author). tavakoli.m@iums.ac.ir, masoumeh.tavakoli@gmail.com

Abstract

Background: Multiple sclerosis is one of the most common autoimmune inflammatory diseases in young ages. Many aspects of this disease are still unknown. The aim of the present study was to investigate the expression and activity level of 15-lipoxygenase-1 (a producer of lipid peroxide and regulating inflammation and immune responses) in peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis and healthy individual and considering its correlation with lipid profile of individuals.

Methods: 30 patients with multiple sclerosis from Firouzgar Hospital in Tehran and 23 healthy subjects as control participated in this case-control study. The peripheral blood mononuclear cells of the subjects were used for mRNA extraction and cDNA construction, and to determine the expression level of 15-Lipoxygenase-1 gene, a Real-Time PCR-based Cyber Green method was used and data were analyzed using ΔΔCT method. Also, the amount of 15-lipoxygenase-1 product (15-S-HETE) in serum was determined by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Finally, statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software version 5 and independent t-test.

Results: Measurement of 15-lipoxygenase-1 expression level in mononuclear blood cells extracted from the peripheral blood of patients with multiple sclerosis and healthy controls revealed that the level of this gene was significantly increased in patients comparing to controls. Also, the activity of 15-lipoxygenase-1 which was measured via its metabolite level in serum of patients and controls demonstrated that the enzyme activity was increased in serum of patients compared to controls ($p<0.05$). Also, the results have shown that in patients with higher level of Cholesterol, Triglyceride and LDL, the level of 15-lipoxygensae-1 and its metabolite had higher level compared to patients with normal lipid profile.

Conclusion: The results of the current study have shown that the 15-lipoxygenase-1 enzymatic pathway might affect multiple sclerosis pathogenesis and due to the significant differences of the enzyme level in patients compared to controls, it can be noticed as a possible pathway for controlling disease. Since elevated lipid profile level is the risk factor of multiple sclerosis pathogenesis, in this study the correlation was observed between the higher level of LDL, Cholesterol and Triglyceride and enzyme expression level and activity which emphasize on the important role of lipid metabolic pathway in multiple sclerosis.

Keywords: Inflammation, HPLC, Gene expression, 15-lipoxygenase enzyme, Multiple sclerosis