Journal of Microbial World
Volume 15, No. 2, September 2022

Original Article

Evaluation of DNA break as a prognosis biomarker in Covid-19 patients in Velayat Hospital, Damghan by commet assay

Elaheh Abiri[1], Mehdi Mirzaiie[2], Majid Moghbeli[3], Amir Atashid[4] , Ahad ali Harati[5]

[1]Ph.D student, Department of Biology, Damghan Branch, Damghan Islamic Azad University, Semnan, Iran.[2]Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Medical Sciences, Shahrood University of Medical Sciences, Semnan, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Damghan Islamic Azad University, Semnan, Iran. [4]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Medical Sciences, Shahrood University of Medical Sciences, Semnan, Iran. [5]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Damghan Islamic Azad University, Semnan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: The coronavirus-19 pandemic is a major global health crisis. Covid-19 is a complex disease with diverse clinical features, from asymptomatic infection to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and dysfunction of a number of organs. Prognostic biomarkers are needed to quickly detect the severity of Covid-19, early in the course of the disease. The purpose of this study is to explain the amount of DNA break as a biomarker for disease prognosis in patients with covid-19.

Materials and Methods: The comet assay was used to compare the damage caused in the DNA of mononuclear lymphocytes in patients with covid-19 in 4 groups; control, hospitalized in the normal ward, hospitalized in the ICU and not intubated, hospitalized in the ICU and intubated.

Results: The results of examining DNA damage in lymphocytes showed that covid-19 leads to cell damage and especially long-term intubation of covid-19 patients in the ICU, caused more DNA damage and caused more tails increase.

Conclusion: The comparison of tails in 4 groups shows that: in people hospitalized in the normal ward, cell damage was less, which could be due to the activation of DNA damage repair systems. As a result, DNA break of lymphocytes has a significant relationship with the prognosis of the disease in patients with Covid-19. In this study, the comet assay was used to compare the damage caused in the DNA of mononuclear lymphocytes in patients with covid-19 in 4 groups; control, hospitalized in the normal ward, hospitalized in the ICU and not intubated, hospitalized in the ICU and intubated.

keywords: Covid-19, DNA Break, ICU, comet assay.

Received: 9 February 2022 Revised: 4 May 2022 Accepted: 9 August 2022

Correspondence to: Mehdi Mirzaiie
Tel: +98 9125736308
E-mail: mirzaii1386@gmail.com

Journal of Microbial World 2022, 15(2): 161-169
DOI:10.30495/jmw.2022.1962727.2027

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره دوم (پیاپی ۵۱) تابستان ۱۴۰۱
صفحات ۱۶۹-۱۶۱

Original Article

ارزیابی شکست DNA به عنوان بیومارکر پیش‌آگهی در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ بستری در بیمارستان ولایت دامغان با روش assay Comet

الهه عبیری[۱]، مهدی میرزایی[۲*]، مجید مقبلی[۳]، امیر آتشی[۴]، احدعلی هراتی[۵]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی دامغان، سمنان، ایران. [۲]دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، سمنان، ایران. [۳]استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی دامغان، سمنان، ایران. [۴]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، ایران. [۵]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی دامغان، سمنان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: بیماری همه‌گیر کروناویروس-۱۹ یک بحران بزرگ بهداشت جهانی با ویژگی‌های بالینی متنوع است، از عفونت بدون علامت تا سندرم دیسترس تنفسی حاد (ARDS) و اختلال عملکرد چند ارگان. به این دلیل، به نشانگرهای زیستی پیش‌بینی‌کننده شدت کووید-۱۹ نیاز فوری وجود دارد تا بیماری در اوایل شروع قابل تشخیص باشد. هدف از انجام این مطالعه، تبیین میزان (DNA break) به‌عنوان یک بیومارکر برای پیش‌آگهی بیماری در مبتلایان به کووید-۱۹ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از آزمون (comet assay) جهت مقایسه آسیب‌های ایجاد شده در DNA لنفوسیت‌های تک‌هسته‌ای در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ در ٤ گروه کنترل، بستری در بخش عادی، بستری در بخش ICU و غیر اینتوبه، بستری در بخش ICU و اینتوبه شده استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی آسیب DNA در لنفوسیت‌ها در ٤ گروه نشان داد که کووید ۱۹ منجر به آسیب سلولی می‌شود و به ویژه قرار گرفتن طولانی مدت اینتوبه شدن بیماران مبتلا به کووید-۱۹ در بخش ICU باعث آسیب DNA بیشتری می‌شود و باعث افزایش بیشتر (tail) ها می‌شود.

نتیجه‌گیری: مقایسه (tail)ها در ٤ گروه نشان می‌دهد: در افراد بستری در بخش عادی آسیب سلولی کمتر بوده است که می‌تواند به دلیل فعال شدن سیستم‌های ترمیم آسیب DNA باشد. همچنین یک رابطه مستقیم بین اینتوبه شدن طولانی مدت در بخش ICU و آسیب DNA وجود داشت و نیز هیچ آسیب قابل توجهی به DNA در لنفوسیت‌ها در افراد گروه کنترل مشاهده نشد. در نتیجه میزان آسیب به DNA (DNA break) لنفوسیت‌ها با پروگنوز بیماری در مبتلایان به کووید-۱۹ ارتباط معناداری دارد.

کلمات کلیدی: کووید-۱۹، آسیب DNA، ICU، comet assay.

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۲/۱٤ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۵/۱۸

مقدمه

در سال‌های اخیر بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ (کووید-۱۹)، تبدیل به یک بیماری همه‌گیر شد و تقریباً در بیش از ۱۵۰ کشور در سراسر جهان گسترش یافت. (SARS-CoV-2) باعث عفونت‌های تنفسی تحتانی و منجر به ذات‌الریه و نارسایی چند عضو می‌شود. تا به امروز، هزاران مورد ابتلا گزارش شده است و هزاران نفر در سراسر جهان جان خود را از دست داده‌اند. انتظار می‌رود هر روز با انتقال انسان به انسان که به دلیل تماس

*) آدرس برای مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود، سمنان، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۵۷۳۶۳۰۸ پست الکترونیک: mirzaii1386@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

نزدیک با یکدیگر و از راه تنفس رخ می‌دهد، افزایش یابد. افزایش تعداد بیماران به دلیل درمان غیراختصاصی در برابر (SARS-CoV-2) میزان مرگ‌ومیر را افزایش می‌دهد. امروزه کروناویروس ۲۰۱۹ هم در کشورهای توسعه یافته و هم در کشورهای در حال توسعه به یک تهدید جدی تبدیل شده است (۱). داده‌های اخیر نشان می‌دهد که علائم و ضعف عمومی ممکن است مدت‌ها پس از پایان عفونت در بیماران بهبود یافته ادامه یابد، که نشان می‌دهد عفونت (SARS-CoV-2) پیامدهای عمیقی در سلول‌های میزبان دارد. این عفونت می‌تواند پاسخ آسیب DNA (DNA damage) را در سلول‌های کلیه میمون سبز آفریقایی (Vero E6) ایجاد کند. مشاهدات نشان می‌دهد که (SARS-CoV-2) ممکن است پیامدهای پاتولوژیکی برای سلول‌های میزبان، فراتر از برانگیختن پاسخ ایمنی‌زا داشته باشد. ویروس‌های RNA عوامل اتیولوژیکی (etiologic) بسیاری از بیماری‌های شایع و کشنده انسان هستند (۲). به خوبی مستند شده است که علیرغم تکمیل چرخه زندگی آن‌ها در سیتوپلاسم سلول میزبان، این ویروس‌ها می‌توانند آسیب قابل‌توجهی در DNA ایجاد کرده و مسیر پاسخ به آسیب را فعال کنند. هر دو رویداد امکان تکثیر و تعدیل عملکردهای سلول میزبان را فراهم می‌کند. ویروس‌های RNA با رشته مثبت از خانواده (Coronaviridae) که (SARS-CoV-2) به آن‌ها تعلق دارد و ویروس آنفلوانزای A رشته منفی از خانواده (Orthomyxoviridae) باعث ایجاد مسیر DDR در سلول‌های میزبان می‌شوند (۵و۴و۳). نیاز مبرم به تسریع کار بر روی درمان‌های خاص برای کاهش بیماری و مرگ و میر وجود دارد. در حال حاظر جایگزینی داروهای موجود به عنوان یک درمان فوری در نظر گرفته شده است، اما این درمان قطعی نیست. علاوه بر این، غربالگری (SARS-CoV-2) در مراحل اولیه ممکن است به نفع افراد آسیب‌پذیر با عامل خطر دیابت، فشار خون بالا و بیماری‌های قلبی عروقی باشد، با این حال، درک مکانیسم (SARS-CoV-2) و دخالت میزبان، دانش را برای توسعه نشانگرهای زیستی و داروها برای درمان این بیماری همه‌گیر ارائه می‌دهد.

(SARS-CoV-2) یک ویروس RNA تک رشته‌ای است که از گروه جنس ß متعلق به (SARS-CoV-2) انسانی با اندازه ژنوم ۳۰ (kbp) مشتق شده است. ژنوم (SARS-CoV-2) بیشتر پروتین‌های ساختاری را در ′۳ (ORF) و پروتین‌های غیرساختاری (nsp) در انتهای ′۵ (odes) رمزگذاری می‌کند. ارتباط معناداری بین مراکز عملکردی تعدیل شده ویروسی با دیابت، فشار خون بالا و بیماری‌های قلبی عروقی وجود دارد. وابستگی متقابل بین قطب‌های عملکردی که به علت استفاده از محیط میزبان توسط ویروس کووید-۱۹ ایجاد شده پس از فعال شدن گیرنده برای فرآیند تکثیر ویروسی را نشان می‌دهد، همچنین پروتین‌ها در مراکز تکثیر ویروسی با بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت و فشار خون بالا ارتباط داشتند که آسیب‌پذیری و شدت عفونت را در افراد در معرض خطر تأیید می‌کرد. علاوه بر این، پروتین‌های مراکز تکثیر، ارتباط تنگاتنگی با سایر عفونت‌های ویروسی، از جمله (MERS) و (HCoVs) دارند که الگوی عفونت مشابهی را در (SARS- CoV-2) نشان می‌دهند (۱). نقشه‌برداری فسفوریلاسیون جهانی و مطالعات مهارکننده (ATR DDR) نشان می‌دهد که (SARS-CoV-2) همچنین ممکن است مسیر (DDR) را برای انتشار در سلول‌های میزبان درگیر کند. پاسخ کلاسیک آسیب DNA توسط یکی از مسیرهای سیگنال‌دهی (ATM-ATR) و (DNA-PK) کینازها انجام می‌شود. شکستگی‌های دورشته‌ای معمولاً (ATM) و مسیرهای (DNA-PK) را درگیر می‌کند، درحالی که DNA تک رشته‌ای مسیر (ATR) کیناز را فعال می‌کند. این مسیرها اثرات پایین دست خاصی مانند (CHK1) توسط (ATR) و (CHK2) توسط (ATM) را فعال می‌کنند تا پاسخ سلولی را تحریک کنند که به سلول‌ها اجازه می‌دهد پیشرفت چرخه سلولی را برای ترمیم DNA آسیب دیده متوقف کنند. مسیر (DDR) جزء مهمی از مکانیسم دفاعی درون سلولی است که با تشخیص ضایعات روی DNA فعال می‌شود تا ترمیم آن توسط هر یک از موارد زیر تسهیل شود: ترمیم برش پایه (BER)، ترمیم برش نوکلئوتیدی (NER)، ترمیم ناهماهنگی (MMR)، پیوند نهایی غیر همولوگ (NHEJ)یا ترکیب مجدد

همولوگ (HR) برای رفع DNA آسیب دیده (۷و۶و۲). هنوز به طور دقیق مشخص نیست که چگونه ویروس‌های RNA-، به ویژه (SARS-CoV-2)، می‌توانند بیان (TRF2) را تعدیل کرده و طول تلومرها را بی‌ثبات کنند. تلومرهای کوتاه با شروع پیری و بسیاری دیگر از شرایط ناتوان‌کننده مرتبط هستند. در سلول‌های (Vero E6)، عفونت (SARS-CoV-2) باعث واکنش (ATR DNA) آسیب می‌شود و بر عملکرد تلومر تأثیر می‌گذارد. فعال شدن (ATR) و بی‌ثباتی تلومر هر دو با بی‌ثباتی ژنوم مرتبط هستند (۲و۱۳). (SARS-CoV-2) تاثیر دائمی در سرتاسر جهان داشته و میلیون‌ها نفر را مبتلا کرده و به دلیل پیامدهای طولانی‌مدت سلامتی، نگرانی را برانگیخته است. با ظهور گونه‌های دائماً در حال تکامل، مطالعه پیامدهای پاتوبیولوژیکی این عفونت در بیماران بهبود یافته حیاتی است. این مطالعه نشان می‌دهد که (SARS-CoV-2) می‌تواند بر سلول‌های میزبان اثر داشته باشد و نیز منجر به شکستگی در DNA شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه، پژوهشی و از نوع آزمایشگاهی بوده و با هدف بررسی اثرات بیماری کووید-۱۹ در بیماران مبتلا در بخش مراقبت‌های ویژه (بخش مراقبت‌های ویژه) که طولانی‌مدت بستری بوده‌اند و اینتوبه نشده بودند و نیز بیماران مبتلا در بخش مراقبت‌های ویژه که اینتوبه شدند و نیز بیماران مبتلا دربخش عادی با این زمینه‌ها بر آسیب DNA انجام شد. در این مطالعه مقطعی از ۲۳ نفر به عنوان گروه اینتوبه بستری در بخش مراقبت‌های ویژه و ۲۴ نفر به عنوان گروه غیر اینتوبه بستری در بخش مراقبت‌های ویژه و ۲۷ نفر به عنوان گروه بستری در بخش عادی و۲۰ نفر به عنوان گروه کنترل نمونه خون گرفته شد. این مطالعه مقطعی برای ارزیابی اثرات کرونا ویروس در بیماران مبتلا در بخش مراقبت‌های ویژه و بخش عادی طراحی شد. شرکت‌کنندگان در این مطالعه همه بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان ولایت دامغان بودند. در نهایت ۷۴ نفر در گروه‌های مختلف وارد مطالعه شدند و ۲۰ نفر به عنوان گروه کنترل بودند. آسیب DNA با استفاده از روش دنباله‌دار قلیایی ارزیابی شد. شاخص‌های سنجش دنباله‌دار، درصد (DNA break) در دنباله، فاکتور دم (درصد) در گروه بخش مراقبت‌های ویژه که طولانی مدت بستری بودند و اینتوبه نشده بودند و نیز بیماران مبتلا در بخش مراقبت‌های ویژه که اینتوبه شدند به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه بستری در بخش عادی و گروه کنترل بود. افزایش تعداد روزهای بستری در بخش مراقبت‌های ویژه و نیز استفاده از ونتیلاتور باعث افزایش شاخص‌های سنجش دنباله‌دار شد، به‌ویژه طول دم (شکل ۱قسمت E) در حالی که کووید-۱۹ در بیماران بستری در بخش عادی تأثیر بسیار کمتری بر این شاخص‌ها داشت. سیگاری‌ها از روند مطالعه حذف شدند. قبل از شروع مطالعه، اهداف تحقیق توسط محققین برای شرکت‌کنندگان توضیح داده شد و آن‌ها رضایت نامه کتبی شرکت در مطالعه را امضا کردند.

الف) اندازه‌گیری آسیب DNA: برای بررسی اثرات کووید-۱۹ از سنجش دنباله‌دار (comet assay) استفاده شد. ۵ سی‌سی خون از ورید پیش کوبیتال کلیه شرکت‌کنندگان توسط پرستار آموزش‌دیده گرفته شد. نمونه‌ها به سرعت به لوله‌های حاوی (EDTA) منتقل شدند. محلول استریل شده و در همان روز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور ارزیابی آسیب DNA، روش سنجش دنباله‌دار قلیایی توصیه شده توسط سینگ و همکاران با برخی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت (۱). به طور خلاصه، لنفوسیت‌ها ۲ ساعت پس از خونگیری با استفاده از (Ficoll-Hypaque) از خون کامل جدا شدند. ۱۴ میکرولیتر محلول در ۲۰۰ میکرولیتر آگارز با نقطه ذوب پایین از قبل گرم شده تعلیق شد و سپس به طور مساوی روی دو لام میکروسکوپ انتهایی مات شده که با یک لایه آگارز با نقطه ذوب معمولی ۱٪ از قبل پوشش داده شده بودند توزیع شد. سپس با قرار دادن ورقه‌ای روی آن یک لایه ژل یکنواخت ایجاد شد. پس از قرار دادن لام‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، ورقه پوششی برداشته شد تا ژل جامد شود. اسلایدها به مدت یک شب در بافر (Lysis) ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl، pH 10، ۲/۵ مولار کلریدسدیم، ۱۰۰ میلی مولار

EDTA، ۵٪ DMSO، ۱٪ Triton X-100 قرار گرفتند. سپس لام‌ها در بافر قلیایی (۳۰۰ میلی‌مولار هیدروکسیدسدیم، ۱ میلی‌مولار EDTA، pH 13) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰ میلی آمپر و ۲۵ ولت، لام‌ها با یک بافر خنثی‌کننده (۰/٤ MTris، pH 7.5) شسته شدند. در نهایت، لام‌ها با ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و سپس دنباله‌دار در هر لام با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Olympus IX71) ، توکیو، ژاپن، عکس‌برداری و سپس با نرم‌افزار (OpenComet) آنالیز شدند (OpenComet) یک تجزیه و تحلیل خودکار از تصاویر سنجش دنباله‌دار و یک پلاگین برای نرم‌افزار (ImageJ) است که عمدتاً با تصاویر میکروسکوپی استفاده می‌شود (۲و١٤).

دنباله‌دارها به طور تصادفی انتخاب شدند و سعی شد کل اسلاید را پوشش داده شود. از گرفتن عکس از دنباله‌دارهایی که در لبه‌ها، همپوشانی‌ها و حباب‌های هوا قرار داشتند، اجتناب شد و شامل آن نشد. نمونه‌ها در یک آزمایشگاه مستقل تجزیه و تحلیل شدند. طول دم، درصد DNA دم، عامل دم (٪) و شاخص آسیب به عنوان آسیب (DNA) گزارش شد. بر اساس مقدار DNA در دم، دنباله‌دارها به پنج دسته تقسیم شدند که شامل تعداد سلول‌هایی با کمتر از ۵٪ DNA در دم (A)، تعداد سلول‌هایی که ۵-۲۰٪ DNA در دم را نشان می‌دهند (B)، تعداد سلول‌هایی با۲۰-٤۰٪ DNA در دم (C)، تعداد سلول‌هایی با ٤۰-۹۵٪ DNA در دم (D) و تعداد سلول‌هایی با بیش از ۹۷٪ DNA در دم (E) را نشان دادند. فاکتورهای دم (٪) طبق فرمول پیشنهادی توسط (Ivancsits) و همکاران محاسبه شد (۳و١٤):

$$\text{Tail factor (\%)} = \frac{A \times FA + B \times FB + C \times FC + D \times FD + E \times FE}{A + B + C + D + E}$$

FA، FB، FC، FDو FE به ترتیب میانگین گروه‌های A (2/5%)، B (12/5%)، C (30%)، D (67/5%) و E (97/5%) هستند.

با توجه به اندازه دم، نوکلوئیدها به پنج گروه از سالم، کلاس صفر، تا حداکثر آسیب، کلاس ٤ طبقه بندی شدند. برای هر فرد، بر اساس پولتا و همکاران (٤) و سپس شاخص خسارت (DI) به صورت زیر محاسبه شد:

شاخص خسارت $(DI) = n1 + 2n2 + 3n3 + 4n4$

کلاس ۱ n، ۲ n، ۳ n و ٤ n به ترتیب تعداد نوکلوئیدها در کلاس ۱، ۲، ۳ و ٤ آسیب هستند.

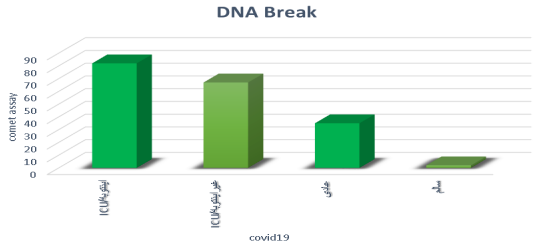
ب) آزمون‌های آماری: تفاوت شاخص‌های سنجش دنباله‌دار بین سه گروه اصلی مورد مطالعه، با استفاده از آزمون (Mann Whitney U) ارزیابی شد. تمامی آزمون‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار (SPSS v ٢٤) انجام شد و مقادیر (P value)(P-value < 0.05) نمونه‌ها با آزمون (T Test) محاسبه و مقایسه شد. نرم‌افزار (OpenComet)، (comet) ها را محاسبه می‌کند. هر چه میزان و شدت این دنباله یا (tail) بیشتر باشد، نمایانگر آسیب بیشتر DNA سلول می‌باشد.

یافته‌ها

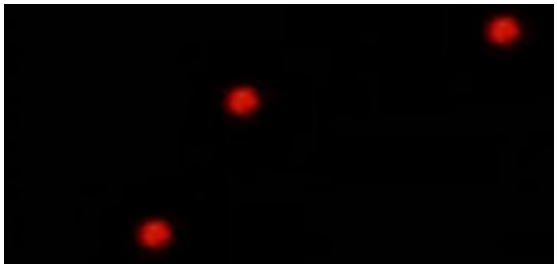
اکثر شرکت‌کنندگان در این مطالعه بیشتر از ۳۰ سال سن داشتند، در این مطالعه، ارتباطی بین شکست (DNA) و افزایش خطر کووید-۱۹ یافت شد که پزشکان را قادر می‌سازد تا بر مبنای آزمایش شکست DNA، بتوانند میزان نیاز بیماران کرونایی به درمان‌های بیشتر را بسنجند. و احتمالا این آزمون (Commetassay) به پزشکان در تشخیص شدت بیماری (پروگنوز) در افراد و تصمیمات بالینی ضروری و زمان ترخیص آن‌ها از بیمارستان، کمک خواهد کرد. این شاخص‌ها به متخصصین درمانگر بیماران کووید-۱۹ کمک می‌کند تا قبل از اینکه حال بیمار، رو به وخامت بگذارد، پروگنوز بیماری را پیشگویی کند و روند درمان تسریع شده و از مرگ و میر جلوگیری شود.

شکست‌های تک رشته‌ای (DNA) با روش (Comet) اندازه‌گیری شدند و پس از افزودن بافرهای لیزکننده و دناتوره‌کننده، تحت الکتروفورز قلیایی قرار داده شدند و در پایان پس از رنگ‌آمیزی، از سلول‌ها عکس‌برداری شد. عکس‌های گرفته شده توسط نرم‌افزار (OpenComet) بررسی شدند و میزان (Tail)ها، تعیین و

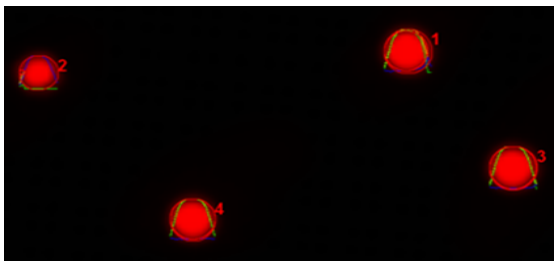
اندازه‌گیری شدند. قسمت‌های مختلف شکل ۱، تعداد سلول‌هایی با کمتر از ۵٪ DNA در دم (A)، تعداد سلول‌هایی که ۵-۲۰٪ DNA در دم را نشان می‌دهند، (B) تعداد سلول‌هایی با ۲۰-۴۰٪ DNA در دم (C)، تعداد سلول‌هایی با ۴۰-۹۵٪ DNA در دم (D) و تعداد سلول‌هایی با بیش از ۹۷٪ DNA در دم (E) را نشان دادند. FA، FB، FC،FD و FE به ترتیب میانگین گروه‌های A (2/5%)، B (12/5%)، C (30%)، D (67/5%) و E (97/5%) هستند. با توجه به اندازه دم، نوکلوئیدها به پنج گروه از سالم تا حداکثر آسیب، طبقه‌بندی شدند. بدین ترتیب آسیب کلی حاصل شده به شکل محدوده‌ای از صفر تا ٤ مورد ارزیابی قرار گرفت و به‌عنوان شاخص کلی میزان آسیب موجود در DNA در شکل ۲ نشان داده شد و مقایسه بین گروهی انجام شد. تمامی استنتاج‌های آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفته است. همچنان که در نتایج حاصل مشاهده می‌شود از مقایسه هر چهار گروه مورد مطالعه، دریافت می‌شود، از نظر ۵ نوع دنبال‌دار، در نوع صفر،۱،۲،۳ دنباله‌دار تفاوت معنی‌داری (P<0/05) وجود دارد. در مقایسه بین گروهی، بین گروه سالم و سه گروه دیگر از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (P<0/05) وجود دارد. هرچه میزان زمان بستری در گروه اینتوبه در (ICU) بیشتر است میزان آسیب به DNA نیز بیشتر است. در مقایسه بین گروهی، گروه‌های چهارگانه آزمون، از نظر فراوانی نوع ۱و۲، دنباله‌دار بین گروه سالم و سه گروه دیگر، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری (P<0/05) وجود دارد که در واقع فراوانی نوع ۱ و۲ دنباله‌دار سلول‌هایی با آسیب متوسط (DNA) در گروه سالم از همه کمتر است.



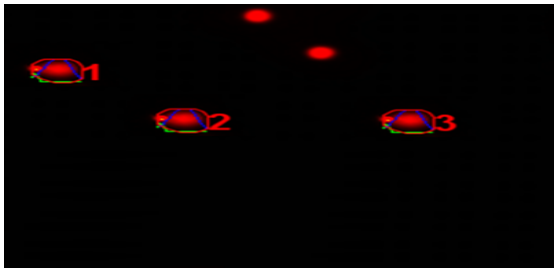
شکل ۲: مقایسه میزان آسیب DNA محاسبه شده برای گروه‌های مورد مطالعه (comet assay) نتایج میانگین درصد آسیب حاصل از شمارش 50 سلول از دو لام مستقل برای هر نمونه از هر گروه است.



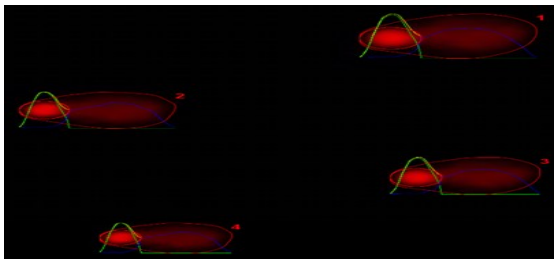
کلاس .: کنترل سالم.



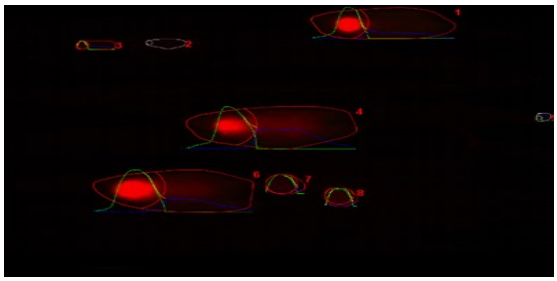
(A) تعداد سلول‌هایی که ۵-۲۰٪ DNA در دم A (2/5%)



(B) تعداد سلول‌هایی با ۲۰-۴۰٪ DNA در دم B (12/5%)



(C)تعداد سلول‌هایی با ۴۰-۹۵٪ DNA در دم D (67/5%)



(E) تعداد سلول‌هایی با بیش از ۹۷٪ DNA در دم E (97/5%)

شکل ۱: نمونه‌هایی از تصاویر دنباله‌دارهای مشاهده شده توسط میکروسکوپ فلورسنت. (۰) دنباله‌دار نوع ۰،(B) دنباله‌دار نوع ۱، (C) دنباله‌دار نوع۲، (D) دنباله‌دار نوع۳، (E) دنباله‌دار نوع ٤.

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات بیماری کووید-۱۹ در بیماران مبتلا در ICU که طولانی مدت بستری بوده‌اند و اینتوبه شده بودند، بیماران مبتلا در ICU که اینتوبه نشده بودند و نیز بیماران مبتلا دربخش عادی با این زمینه‌ها بر آسیب DNA انجام شد. در این مطالعه مقطعی از ۷۴ نفر از بیماران مبتلا به عنوان گروه مورد مطالعه و ۲۰ نفر به عنوان گروه افراد سالم شاهد نمونه خون گرفته شد. با استفاده از روش دنباله‌دار قلیایی، آسیب DNA ارزیابی شد. شاخص‌های سنجش دنباله‌دار، فاکتور دم (درصد) ، درصد DNA دنباله و شاخص آسیب در گروه اینتوبه بخش ICU به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. افزایش تعداد روزهای بستری در بخش ICU، استفاده از ونتیلاتور و نیز بیماری‌های زمینه‌ای شامل بیماری قلبی، دیابت، (COPD)، آسم، بیماری کلیوی، کانسر و بیماری کبدی مزمن باعث افزایش شاخص‌های سنجش دنباله‌دار شد، به ویژه طول دم. در حالی که کووید-۱۹ در بیماران بستری در بخش عادی که فاقد بیماری زمینه‌ای بودند، تأثیر کمتری بر این شاخص‌ها داشت (۱۴). استرس اکسیداتیو، عدم تعادل بین مکانیسم‌های اکسیدان و آنتی‌اکسیدان پس از قرار گرفتن در معرض محرک‌های مضر، نقش اساسی در پاتوژنز عفونت‌های ویروسی ایفا می‌کند.

فعال شدن حاد سیستم ایمنی بدنبال عفونت ویروسی با افزایش استرس اکسیداتیو در نتیجه تکثیر ویروس و التهاب متعاقب آن همراه است. تحت این شرایط التهابی اجزای سلولی ایمنی، افزایش سطح اکسیژن فعال (ROS)و گونه‌های نیتروژن (RNS)، دو نماینده اصلی اکسیداتیو را تولید می‌کنند و تولید آسیب DNA اکسیداتیو و فعال‌سازی پاسخ آسیب DNA (DDR) را کاتالیز می‌کنند، که نشان‌دهنده ارتباط بین فعال‌سازی حاد ایمنی، افزایش استرس اکسیداتیو و ایجاد آسیب DNA است. از سوی دیگر، بیماری‌های خودایمنی سیستمیک با فعال شدن مزمن ایمنی مشخص می‌شوند که در نهایت منجر به آسیب بافتی می‌شوند (۱۹و۱۸). جدا از فعال‌سازی مزمن سیستم ایمنی، بیماران خودایمنی مثل SLE، تولید بیش از حد گونه‌های پرواکسیدان و مکانیسم‌های معیوب) (DDR) را نشان می‌دهند، که منجر به تجمع قطعات DNAسیتوزولی می‌شود که ممکن است به عنوان محرک‌های ایمنی قوی عمل کنند(۲۰و۱۸). در اینجا، سوالی که پیش می‌آید این است که چگونه فعال‌سازی گذرا سیستم ایمنی باعث ایجاد شبکه (DDR) می‌شود و اینکه آیا این در فعال‌سازی سیستم ایمنی مزمن متفاوت است یا خیر. برای این منظور، پارامترها و عوامل مهم (DDR) را که منجر به تشکیل آسیب DNA در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) می‌شود، از افراد سالم پس از واکسیناسیون علیه آنفولانزا و (SARS-CoV-2) در مقایسه با بیماران (SLE) با سطوح فعالیت بیماری متغیر ارزیابی شد (۲۱).

نتیجه‌گیری

جمع‌بندی نتایج حاکی از آن است که افراد مسن مبتلا به کووید-۱۹ بستری در بخش (ICU) که طولانی مدت اینتوبه شده‌اند، بیشترین مقدار آسیب در DNA را نشان می‌دهند. افراد مبتلا به کووید-۱۹ که در بخش عادی بستری شده‌اند آسیب کمتری در DNA رانشان داده‌اند. افراد سالم مقادیر بسیار اندکی از آسیب DNA را نشان دادند که می‌تواند ناشی از قرار گرفتن جامعه مورد مطالعه در معرض عوامل محیطی و شیمیایی متفاوت باشد. آسیب به DNA در افراد اینتوبه نسبت به افراد کنترل به طور معنادار افزایش یافت ($P<0.05$).

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی دامغان (IR.IAU.DAMGHAN.REC.1400.005) قرار گرفت. اهداف مطالعه توسط محققین برای کلیه شرکت‌کنندگان توضیح داده شد و قبل از شروع مطالعه رضایت نامه کتبی توسط شرکت‌کنندگان امضا شد. به شرکت کنندگان اطمینان داده شد که اطلاعات آن‌ها محرمانه خواهد ماند و آن‌ها می‌توانند هر زمان که مطالعه را بدون هیچ عواقبی ترک کنند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان انجام شده است.

تعارض منافع

وجود ندارد.

Reference

1.Ahmed, Shiek SSJ, et al. "Regulatory cross talk between SARS-CoV-2 receptor binding and replication machinery in the human host." *Frontiers in Physiology* (2020): 802.

2.Victor, Joshua, et al. "SARS-CoV-2 triggers DNA damage response in Vero E6 cells." *Biochemical and biophysical research communications* 579 (2021): 141-145.

3.Xu, Ling Hui, et al. "Coronavirus infection induces DNA replication stress partly through interaction of its nonstructural protein 13 with the p125 subunit of DNA polymerase δ." *Journal of Biological Chemistry* 286.45 (2011): 39546-39559.

4.Li, Na, et al. "Influenza infection induces host DNA damage and dynamic DNA damage responses during tissue regeneration." *Cellular and molecular life sciences* 72.15 (2015): 2973 -2988.

5.Lakshmi, AN Vijaya, et al. "Detection of influenza virus induced DNA damage by comet assay." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 442.1 (1999): 53-58.

6.Yang, Jun, et al. "ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses." *Carcinogenesis* 24.10 (2003): 1571-1580.

7.Tubbs, Anthony, and André Nussenzweig. "Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer." *Cell* 168.4 (2017): 644-656.

8.X. Guo, Y. Deng, Y. Lin, W. Cosme-Blanco, S. Chan, H. He, G. Yuan, E.J. Brown, S. Chang Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis EMBO J., 26 (22) (2007), pp. 4709-4719

9.S.A. Kamranvar, M.G. Masucci The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress Leukemia, 25 (6) (2011), pp. 1017-1025

10.Garcia Jr, Gustavo, et al. "Antiviral drug screen identifies DNA-damage response inhibitor as potent blocker of SARS-CoV-2 replication." *Cell reports* 35.1 (2021): 108940.

11.Smogorzewska, Agata, et al. "Control of human telomere length by TRF1 and TRF2." *Molecular and cellular biology* 20.5 (2000): 1659-1668.

12.Kamranvar, S. A., and M. G. Masucci. "The Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress." *Leukemia* 25.6 (2011): 1017-1025.

13.Kong, Chiou Mee, Xiao Wen Lee, and Xueying Wang. "Telomere shortening in human diseases." *The FEBS journal* 280.14 (2013): 3180-3193.

14.S. Ivancsits, E. Diem, A. Pilger, H.W. Rüdiger, O. Jahn, Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts, Mutation Research/Genetic toxicology Environmental Mutagenesis, 519 (2002) 1-13.

15.Lin, Ping-Yuan, et al. "Avian reovirus S1133-induced DNA damage signaling and subsequent apoptosis in cultured cells and in chickens." *Archives of virology* 156.11 (2011): 1917-1929.

16.Benavente J, Martinez-Costas J (2007) Avian reovirus: structure and biology. Virus Res 123:105–119

17.Shmulevitz, Maya, et al. "Cell-cell fusion induced by the avian reovirus membrane fusion protein is regulated by protein degradation." *Journal of virology* 78.11 (2004): 5996-6004.

18.Ntouros, Panagiotis A., et al. "Effective DNA damage response after acute but not chronic immune challenge: SARS-CoV-2 vaccine versus Systemic Lupus Erythematosus." *Clinical Immunology* 229 (2021): 108765.

19.Doria, A., et al. "Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide." *Autoimmunity reviews* 12.1 (2012): 22-30.

20.Shen, Yu J., et al. "Genome-derived cytosolic DNA mediates type I interferon-dependent rejection of B cell lymphoma cells." *Cell reports* 11.3 (2015): 460-473.

21.Jha, Awadhesh N. "Ecotoxicological applications and significance of the comet assay." *Mutagenesis* 23.3 (2008): 207-221.