www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. ۵۸, No. ۱, P: ۱-۶
Mar ۲۰۱۵

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۸، شماره ۱
فروردین ۹٤ ، صفحه ۱۳-٦

مقاله اصلی

بررسی رابطه پلی مورفیسم ژنی کالپروتکتین و بیماریهای التهابی روده

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲٦- تاریخ پذیرش:۹۳/۱۱/۲۰

[۱]مهدی مولوی
[۲]حافظ فاخری*
[۳]علی بهاری
[۴]حسن وثوقی نیا
[۵]زهره باری
[۶]عباس اسماعیل زاده
[۷]آزیتا گنجی
[۸]محمد هاشمی
[۹]محمد خواجه دلوئی
[۱۰]غلامرضا بهاری
[۱۱]بهاره امین
[۱۲]کامران غفارزادگان

۱-استادیار گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۲-استاد گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ساری، ساری، ایران
۴،۳-دانشیار گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵-دستیار فوق تخصصی گوارش و کبد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ساری، ساری، ایران
۷،۶-استادیار گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۸-استاد گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۹--دانشیارگروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۱۰-مربی بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۱۱-استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۱۲-کلینیکال پاتولوژیست، بیمارستان رضوی، مشهد، ایران*
ساری-دانشگاه علوم پزشکی مازندران -مرکز تحقیقات بیماریهای التهابی گوارش فوقانی، مازنداران، ایران
تلفن : ۴- ۲۲۶۱۷۰۱ -۱۵-۹۸+
email:fakher٤٢@yahoo.com

خلاصه

مقدمه

کالپروتکتین یک مدیاتور التهابی مهم در بیماریهای التهابی روده می باشد و از دو ساب یونیت S۱۰۰A۹ و S۱۰۰A۸ تشکیل شده است. هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژنتیکی تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism)کالپروتکتین در سرم بیماران کولیت اولسراتیو و کرون و ارتباط آن با رفتار بیماری است.

روش کار

مطالعه، بر روی ۱۶۶ بیماردچار کولیت اولسراتیویا کرون (۸۴ مرد و ۸۲ زن) انجام شد. بعد از گرفتن نمونه خون وریدی از بیماران،DNA نمونه ها تخلیص و ژنوتیپ کالپروتکتین برای دو فرم تک نوکلئوتیدی C/T rs۳۸۰۶۲۳۲ از ژن S۱۰۰A۸و rs۳۰۱۴۸۶۶C/T از ژن S۱۰۰A۹ ، به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز PCR(Polymerase Chain Reaction) مشخص شد. ارتباط پلی مورفیسم با شرایط مختلف از جمله سن، جنس، وسعت درگیری، تعداد عود، شدت بیماری (بر اساس نیاز به داروهای خط دوم و سوم) و تظاهرات خارج روده ای (آرتریت، کلانژیت اسکلروزان، عوارض پوستی و چشمی)، دیس پلازی و سرطان کولون مقایسه گردید.

نتایج

شایعترین ژنوتیپ S۱۰۰A۹ در بیماران ، CT و شایعترین ژنوتیپ S۱۰۰A۸، TTبود (P <۰/۰۵). اکثر بیماران مبتلا به آرتریت دارای ژنوتیپ CC از S۱۰۰A۹ بودند و ارتباط بین این ژنوتیپ و آرتریت معنی دار بود (P <۰/۰۵). اختلاف معنی داری بین سن، جنس، مدت زمان، وسعت درگیری وابتلا به سایرتظاهرات خارج روده ای و ژنوتیپ کالپروتکتین مشاهده نشد. ژنوتیپ TT ژن S۱۰۰A ۸ ارتباط معنی داری در بیمارانی داشت که برای کنترل بیماری، درمانهای خط دوم شامل کورتیکوستروئیدها و آزاتیوپرین را دریافت کرده بودند (P <۰/۰۵). در بررسی ها گرچه ارتباط معنی داری بین بیماران با ۱ تا ۲ بارحملات بیماری در سال و ژنوتیپ کالپروتکتین دیده نشد ، در ۱۰ بیمارکه در سال گذشته حداقل ۳ بار دچار عود بیماری شده بودند، ژنوتیپ CC ژن S۱۰۰A۹ شایعتر از سایر ژنوتیپها بود (P <۰/۰۵).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان می دهد که پلی مورفیسم ژنتیکی کالپروتکتین می تواند در برخی رفتار های بیماریهای التهابی روده از جمله شدت بیماری (براساس داروهای مورد نیاز برای کنترل بیماری) ، عوارض خارج روده ای (آرتریت) و حملات بیماری تاثیر گذار باشد. مطالعات بیشتری لازم است که به بررسی دقیقتر اهمیت این پلی مورفیسم در ایجاد بیماری و ارتباط آن با شدت فعالیت بیماری و سایرویژگیهای بیماری بپردازد.

کلمات کلیدی: بیماریهای التهابی روده، پلی مورفیسم ژنتیکی، تظاهرات خارج روده ای، کالپروتکتین

پی نوشت: این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد می باشد و تضاد منافعی وجود ندارد.

مقدمه

شیوع بیماریهای التهابی روده [۱](IBD) در سالهای اخیر افزایش چشمگیری داشته است (۲, ۱). شیوع این بیماری ها و ویژگی های آنها در کشور ما به جمعیت های آسیایی نزدیک است و در بسیاری از موارد با آنچه در کشور های غربی دیده می شود تفاوت دارد (۳). از طرفی رفتار بیماری در بیماران ایرانی نیزبا یکدیگر متفاوت می باشد. بر اساس مطالعات قبلی، نقش ژنتیک، اختلال در تنظیم سیستم ایمنی، عوامل لومینال و مسائل محیطی در پاتوژنز این بیماریها اثبات شده است. درپروسه های التهابی مخاط روده، عوامل ایمونولوژیک متعددی دخیل هستند، یکی از این عوامل پروتئین کالپروتکتین است که نقش آن در روندهای التهابی اثبات شده است (۶-۴). کالپروتکتین مجموعه ای از دو هترودیمر سبک S۱۰۰A۸ و سنگین S۱۰۰A۹ است که در سیتوپلاسم نوتروفیل ها و غشاء مونوسیت ها وجود دارد. به دنبال فعال شدن نوتروفیلها و مونوسیت ها، کالپروتکتین در سرم و مایعات بدن آزاد شده و می تواند به عنوان یک بیومارکر التهاب در بیماریهای التهابی از جمله آرتریت، پریودنتیت، سیستیک فیبروزیس، کلانژیت اسکلروزان و بیماریهای التهابی روده مثل کرون وکولیت اولسراتیو شناخته می شود (۱۱-۷).کالپروتکتین پپتیدی با ویژگیهای منحصر بفرد است که از طریق القای تولید نیتریک اکسید [۲](NO) وتحریک ایمنی ذاتی، کموتاکسی، تنظیم فعالیت آنزیم [۳](NOX۲) در فاگوسیتوز و اثرات باکتریوستاتیک بر باکتریهایی نظیر اشریشیا کولی [۴](E.coli) باعث محدود کردن عوامل مهاجم می شود، ولی از طرفی غلظت بالای آن در محل التهاب در ایجاد عوارض ناشی از التهاب نظیر تخریب بافتی، تولید گونه های فعال اکسیژن [۵](ROS)، آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) و تأخیر در ترمیم بافتی نقش دارد (۱۳, ۱۲). بنابراین تظاهرات و رفتار بیماری های التهابی نظیربیماریهای التهابی روده ممکن است با میزان فعالیت وخصوصیات این مدیاتورهای التهابی و تفاوتهای کمی وکیفی در بیان ژنی آنها مرتبط باشد. مطالعات اخیر نیز نشان داده اند که هدف قرار دادن کالپروتکتین به عنوان یک برخورد درمانی جدید می تواند در مهار علایم وعوارض بیماری های التهابی از جمله IBD مؤثر باشد (۱۵, ۱۴). با توجه به تفاوت رفتار بیماریهای التهابی روده در جمعیتهای مختلف و نقش مهم کالپروتکتین در بروز التهاب و عوارض آن، این مطالعه با هدف بررسی فراوانی پلی مورفیسمهای ژنتیکی کالپروتکتین دراین بیماران و ارتباط آن با رفتار بیماریهای التهابی روده در ایران انجام شد.

روش کار

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی-مقطعی می باشد. با توجه به بیماری مورد مطالعه و عدم انجام مطالعات مشابه، حجم نمونه به صورت در دسترس معادل ۱۷۰ نفرتعیین شد. این مطالعه بر روی تمونه های جمع آوری شده بیماران از شهرهای مشهد و ساری سالهای بین ۹۳-۹۲ انجام گرفت. بیمارانی وارد مطالعه شدند که مبتلا به کرون یا کولیت اولسرو- اعم از فرم فعال یا غیر فعال بیماری- بوده و تشخیص آنها بر اساس یافته های اندوسکوپیک و بافت شناسی به اثبات رسیده بود. معیار های خروج عبارت بود از: وجود هر گونه بیماری سیستمیک غیر از بیماری التهابی روده. ابتدا پرسشنامه بیماران واجد شرایط با توجه به خصوصیات دموگرافیک و پرونده پزشکی و شرح حال آنها تکمیل شد. متغیرهای مورد مطالعه عبارت بودند از: سن، جنس، نوع بیماری-کرون یا کولیت اولسرو- براساس یافته های بالینی کولونوسکوپی، پاتولوژی و رادیولوژی، مدت زمان بیماری از زمان تشخیص، تعداد عود بیماری در سال، وسعت درگیری روده، عوارض خارج روده ای شامل آرتریت، کلانژیت اسکلروزان اولیه، عوارض چشمی وعوارض پوستی، وجود دیسپلازی و شدت آن، سرطان کولون، رژیم درمانی بیمار و سابقه کولکتومی. سپس ۲ cc نمونه خون وریدی بیماران گرفته شد و DNA نمونه خون این افراد به روش نمکی [۶] تخلیص شده و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ناحیه های مورد نظر برای ژن کالپروتکتین تعیین و آلل [۷] های مورد نظر (شامل rs۳۸۰۶۲۳۲ از ژن S۱۰۰A ۸ وC/T rs۳۰۱۴۸۶۶ از ژن

[۱] Inflammatory Bowel Disease
[۲] Nitric Oxide
[۳] NADPH Oxidae
[۴] Escherichia Coli
[۵] Reactive Oxygen Species
[۶] Salting out
[۷] Allele

S۱۰۰A۹) به روش[۸] PCR تکثیر شد. انجام آزمایشات PCR در مرکز تحقیقات بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان صورت گرفت و نمونه های خونی بیماران شهرهای مشهد و ساری قبل از ارسال در دمای ۲۰- نگهداری شده و طی مدت۱ ماه از زمان نمونه گیری جهت تخلیص DNA ارسال شد (۱۶). به این منظور ۵۰۰ میکرولیترخون تام حاوی EDTA[۹]، به ۸۰۰ میکرولیتر بافرشماره ۱ شامل ۱/۵۷گرم [۱۰]تریس هیدروکلریک اسید،۱۱۰گرم ساکارز، ۱/۰۱گرم[۱۱]منیزیم کلرید و۱۰میلی لیترتریتون[۱۲] (به منظورهضم غشاءلیپیدی) دریک لیتر محلول آبی به منظور لیزکردن RBC ها اضافه شد. مخلوط فوق در دور g ۷۰۰۰به مدت ۲دقیقه سانتریفیوژ شده، محلول رویی را دور ریخته و این عمل یکبار دیگر بمنظور ازبین بردن باقیمانده RBC ها تکرار شد. مجددا محلول رویی را دور ریخته به باقیمانده که یک رسوب شیری رنگ حاوی گلبولهای سفید خون (WBC)[۱۳] بوده،۴۰۰میکرولیتر بافرشماره ۲ (حاوی۱/۵۷گرم Tris HCl و۳/۷۵گرم EDTA و۶۰ میکرولیتر ۱۰٪[۱۴]SDS دریک لیتر محلول آبی) اضافه ومخلوط به مدت ۱۵ دقیقه دردمای ۲۵تا۳۰درجه سانتیگراد نگهداری شد.

به محلول مرحله قبل ۱۵۰میکرولیتر محلول [۱۵] کلرید سدیم اشباع و۵۰۰ میکرولیترکلروفرم اضافه نموده ورتکس کرده ودر دور g ۷۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژشد. محلول رویی را باسمپلر به میکرو تیوب دیگری منتقل کرده و به آن ۸۰۰میکرولیتر پروپانول سرد اضافه کرده دردمای ۴درجه سانتیگراد به مدت یکساعت قرار داده تا کلاف DNA تشکیل شود. سپس در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۲دقیقه سانتریفیوژکرده، به رسوب ،۸۰۰میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده ودر دور g۱۲۰۰۰به مدت ۲دقیقه سانتریفیوژتکرار شد. رسوب به دست آمده را به مدت ۲۰دقیقه درانکوباتور ۳۰درجه سانتیگراد انکوبه کرده تا تمامی الکل تبخیر شود. سپس ۱۰۰میکرولیتر آب مقطر به رسوب اضافه نموده و به مدت ۲۴ساعت در یخچال نگهداری می کنیم. این DNA را می توان دردمای ۲۴- درجه سانتیگراد تا زمان انجام PCR نگهداری کرد (تمامی مواد ومعرفهای به کار رفته از شرکت مرک آلمان تهیه شده بودند). پرایمرهای به کاررفته برای سه جایگاه واندازه محصولات هریک به شرح زیر می باشد (جدول شماره ۱).

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی ژنوتیپ

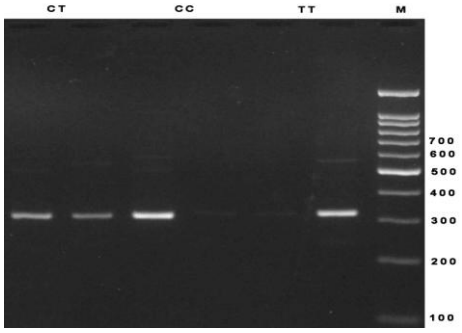
اندازه	توالی پرایمرها) ۳-۵(	ژنها
bp[۱۶] ۲۵۷	Forward: ACATCCCTGAAACTGAATTG Reverse (C allele): AGGAATGGATATAGCCCTTGGAG Reverse (T allele): AGGAATGGATATAGCCCTTGGAA	۸S۱۰۰A ۳۸۰۶۲۳۲rs
bp ۳۲۴	Forward: CAGGTGCATCTCAGCAGTGT Reverse (T allele): CGGGGCTTGGCAATAGA Reverse (C allele): CGGGGCTTGGCAATAGG	S۱۰۰A۹ rs۳۰۱۴۸۶۶

برای انجام PCR به ازای هرنمونه ۸ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰میکرولیتر ماستر میکس واز هریک از پرایمرها۰/۵میکرولیتر افزوده و۱۹میکرولیتر از مخلوط را به میکروتیوب ۰/۲میلی لیتری منتقل وبه آن۱میکرولیتر DNA اضافه کرده و PCR باشرایط زیرانجام شد.۱-۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه. ۲-۹۵درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه. ۳-۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه. ۴-۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه. مراحل۲ لغایت۴ به تعداد ۳۰ سیکل تکرار وسپس ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه ودرانتها، ۶-۱۵درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ثانیه در دستگاه چرخه حرارتی[۱۷] مدل Bio-Rad Mini قرار داده شد. حال این نمونه جهت الکتروفورز آماده شده است. نمونه ها را روی ژل آگارز ۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه وولتاژ ۹۵ ولت در دستگاه الکتروفورز مدل Labnet۳۰۰ قرارداده و ژل مربوطه را با دستگاه ژل داک (کیماژن) خوانده وژنوتیپ نمونه ها تعیین شد. اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS[۱۸] تجزیه و تحلیل شد. جهت مقایسه فراوانی ژنوتیپ ها از آزمون آنووا[۱۹] و تست تعقیبی توکی[۲۰] و برای مقایسه داده های اسمی از آزمون [۲۱]کای اسکوئر استفاده شد. ارزش احتمال (P Value)[۲۲] کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

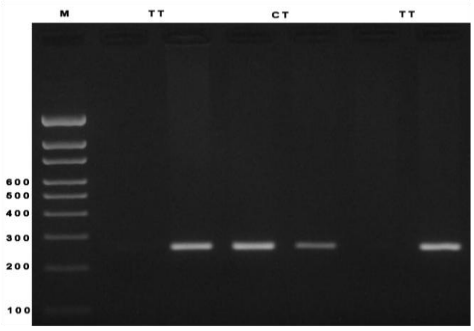
[۸] Polymerase Chain Reaction
[۹] Ethylenediaminetetraacetic acid
[۱۰] Tris Hydrochloric acid (Tris HCL)
[۱۱] $MgCl_2$
[۱۲] Triton
[۱۳] White Blood Cell
[۱۴] Sodium Dodecyl Sulphate
[۱۵] NaCl
[۱۶] Basic pairs
[۱۷] Thermal cycler
[۱۸] Statistical Package for the Social Sciences
[۱۹] Analysis of Variance (ANOVA)
[۲۰] Tukey's HSD
[۲۱] Pearson Chi-Square
[۲۲] Probability Value

نتایج

از تعداد ۱۷۰ بیمار مورد مطالعه، ۱۶۶ نفر شرایط مطلوب را داشته و در مطالعه باقی ماندند و۱ نفر به علت ابتلا به لوپوس اریتماتوس، ۲نفر مبتلا به دیابت تیپ ۱ و ۱نفر به علت عدم رضایت به نمونه گیری از مطالعه خارج شدند. ۸۴ مرد و ۸۲ زن وارد مطالعه شدند. میانگین سنی زنان ۴۳ و مردان ۴۵ بود. از این تعداد ۱۳۲ بیمار کولیت اولسراتیو و۳۴ بیمار کرون داشتند. ژنوتیپ های به دست آمده در شکل۱ و۲ قابل مشاهده می باشد.



شکل۱- تصویرنتایج مربوط به الکتروفورز پلی مورفیسم rs۳۰۱۴۸۶۶ ژن S۱۰۰A۹ بر روی ژل آگارز۲ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم برماید. ستون ۱ (M)سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۳,۲ نمونه هموزیگوت با ژنوتیپTTوستون شماره ۴و۵ نمونه هموزیگوت با ژنوتیپ CC وستون ۶و۷ نمونه هتروزیگوت با ژنوتیپ CT را نشان می دهد (اندازه باندbp ۳۲۴).



شکل۲- تصویرنتایج مربوط به الکتروفورز پلی مورفیسم ۳۸۰۶۲۳۲ rs ژن S۱۰۰A۸ ر روی ژل آگارز۲درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم برماید. ستون ۱ (M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۳,۲ نمونه هموزیگوت با ژنوتیپTTوستون شماره ۴و۵ نمونه هتروزیگوت با ژنوتیپ CT وستون شماره ۶و۷ نمونه هموزیگوت با ژنوتیپ TT را نشان می دهد (اندازه باند bp ۲۵۷).

همانطور که در شکل۱ نشان داده می شود، پپتید تک نوکلئوتیدی rs۳۰۱۴۸۶۶ ژن S۱۰۰A۹ فرمهای هموزیگوت CC،TT و فرم هتروزیگوت CT را نشان می دهد. در حالیکه پپتید تک نوکلئوتیدی rs۳۸۰۶۲۳۲ ژن S۱۰۰A۸، ژنوتیپ CC ندارد وژنوتیپ به فرمهای هموزیگوت TT و هتروزیگوت CT دیده می شود (شکل۲). مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف درجدول۲ نشان داده شده است. شایعترین ژنوتیپِ S۱۰۰A۹ در بیماران مورد مطالعه CT و شایعترین ژنوتیپِ S۱۰۰A۸ در بیماران مورد مطالعه ژنوتیپTT بود (P <۰/۰۵). ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ کالپروتکتین و نوع بیماری التهابی روده (کرون-کولیت اولسرو) دیده نشد. ۳۵ نفر(۲۱ ٪) از بیماران مورد مطالعه تظاهرات خارج روده ای داشتند که آرتریت با ۱۸ نفر، کلانژیت اسکلروزان اولیه با ۱۲ نفر، اریتم ندوزوم با ۳ نفر و اسکلریت با ۲ نفر شایعترین تظاهرات خارج روده ای بیماران مورد مطالعه بودند. ارتباط معنی داری بین ابتلا به آرتریت وژنوتیپ های S۱۰۰A ۸ دیده نشد؛ در حالیکه اکثر بیماران مبتلا به آرتریت دارای ژنوتیپ CC از S۱۰۰A۹ بودند و ارتباط بین این ژنوتیپ و آرتریت معنی دار بود (P <۰/۰۵).

جدول۲- فراوانی ژنوتیپ های بدست آمده ژن S۱۰۰A۹ و S۱۰۰A ۸

ژن	ژنوتیپ	فرکانس (درصد)
S۱۰۰A۹ (۳۲۴)	CC	۳۱(۱۸/۷٪)
	CT*	۱۱۱ (۶۶/۹٪)
	TT	۲۴ (۱۴/۵٪)
S۱۰۰A۸ (۲۵۷)	CT	۳۲ (۱۹/۳٪)
	TT *	۱۳۴ (۸۰/۷٪)

*P <۰/۰۵ درمقایسه ژنوتیپها با هم بر اساس آزمون آماری آنوا و تست تعقیبی Tukey's

جدول۳- ارتباط بین پلی مورفیسم ژنی S۱۰۰A۸ و S۱۰۰A۹ و متغیرهای مورد مطالعه در بیماران کولیت اولسراتیو و کرون

متغیرهای مختلف						
شدت بیماری (براساس داروی	کانسر کولون	دیس پلازی	تظاهرات خارج روده ای	عود بیماری در	عود بیماری در	عود بیماری	پلی مورفیسم

تجویز شده)										
داروی خط سوم	داروی خط دوم			درگیری چشم/پوست	کلانژیت اسکلروز دهنده نکروزان	آرتریت	طی ۳ سال	طی ۲ سال	در طی ۱سال	ژنی
P = ۰/۴۵	P < ۰/۰۰۱	P = ۰/۷	P = ۰/۵	P = ۰/۸۷	P = ۰/۹	P = ۰/۲	P = ۰/۱۵	P = ۰/۲	P = ۰/۵۳	S۱۰۰A۸
P = ۰/۸۹	P = ۰/۰۸	P = ۰/۳	P = ۰/۶۵	P = ۰/۳۲	P = ۰/۴۶	P < ۰/۰۱	P = ۰/۰۲	P = ۰/۷	P = ۰/۱	S۱۰۰A۹

جدول٤– ارتباط بین پلی مورفیسم ژنی S۱۰۰A ۸ و S۱۰۰A۹ و وسعت درگیری روده در بیماران کولیت اولسراتیو و کرون

پلی مورفیسم ژنی	وسعت بیماری							
	کولیت اولسراتیو				بیماری کرون			
	پانکولیت	کولیت چپ	کولیت دیستال	پروکتیت	ایلئوژژونیت	ایلئوکولیت	کولیت	پری آنال
S۱۰۰A۸	P = ۰/۵۷	P = ۰/۱۲	P = ۰/۱۵	P = ۰/۹۲	P = ۰/۱۹	P = ۰/۱۷	P = ۰/۲۵	P =۰/۷
S۱۰۰A۹	P = ۰/۱	P = ۰/۷	P = ۰/۲۲	P = ۰/۲	P = ۰/۴	P = ۰/۵۲	P = ۰/۶	P = ۰/۷۳

شایعترین ژنوتیپ بیماران مبتلا به کلانژیت اسکلروزان اولیه در ژنهای S۱۰۰A۸ وS۱۰۰A۹ به ترتیب TT و CT بود ولی اختلاف معنی داری بین ابتلا به کلانژیت اسکلروزان اولیه و ژنوتیپ کالپروتکتین مشاهده نشد. همچنین اختلاف بین شیوع سایرتظاهرات خارج روده ای بیماران شامل تظاهرات پوستی و چشمی وژنوتیپهای مورد مطالعه معنی دار نبود. در ۱۲۰ بیمار مورد مطالعه برای کنترل بیماری ، درمانهای خط دوم شامل استروئیدها و آزاتیوپرین تجویز شده است که ۱۰۲ نفر (۸۵ ٪) دارای ژنوتیپ TT ژن S۱۰۰A۸ بودند و این ژنوتیپ ارتباط معنی داری با این گروه از بیماران داشت (P <۰/۰۵)، ولی آنالیز داده ها ارتباط معنی داری بین این بیماران و ژنوتیپ های S۱۰۰A۹ نشان نداد (P >۰/۰۵).

در ۱۶ بیمار از بیماران مورد بررسی داروهای خط سوم (اینفلیکسیماب یا سیکلوسپورین) جهت کنترل بیماری تجویز شده بود، ولی استفاده از این داروها ارتباط معنی داری با ژنوتیپهای مورد مطالعه کالپروتکتین نداشت. دو بیمار مورد مطالعه به علت دیس پلازی و ۱ بیمار با تشخیص کانسر کولون کولکتومی شده بودند که همگی ژنوتیپ TT ژن S۱۰۰A۸ و CT ژن S۱۰۰A۹ داشتند، ولی ارتباط معنی داری با این ژنوتیپها دیده نشد. در بررسی ها گرچه ارتباط معنی داری بین بیماران با ۱ و ۲ بارحملات بیماری در سال و ژنوتیپ کالپروتکتین دیده نشد ، در ۱۰ بیمارکه در سال گذشته حداقل ۳ بارعود بیماری داشته اند، ژنوتیپ CC ژن S۱۰۰A۹ بطور معنی داری شایعتر از سایر ژنوتیپها بود (P <۰/۰۵) (جدول۳). بیماران کرون که درگیری پری آنال داشتند، ژنوتیپ CT ژن S۱۰۰A۹ و ژنوتیپ TT ژن S۱۰۰A۸ داشتند، ولی اختلاف معنی دار نبود (P =۰/۷) و بطور کلی وسعت درگیری روده در بیماری کرون و کولیت اولسرو با ژنوتیپهای کالپروتکتین بی ارتباط بود (جدول۴).

بحث

کالپروتکتین پپتیدی با ویژگیهای منحصر بفرد است وبه عنوان بیو مارکر و بازیگر اصلی فرایندهای پاتوفیزیولوژیک در بیماریهای التهابی از جمله بیماریهای التهابی روده مثل کولیت اولسراتیو و کرون شناخته می شود (۸). کالپروتکتین با افزایش تولید کموکینهای[۲۳] التهابی خاص وافزایش بیان مولکولهای چسبنده پاسخ التهابی را تحریک می کند (۵).

افزایش پروتئین کالپروتکتین در مدفوع بیماران به عنوان یک بیومارکرمفید در شناخت وضعیت بیماران التهابی روده شامل کرون و کولیت اولسراتیو شناخته می شود (۱۷).

در مطالعه لیچ[۲۴]و همکاران، افزایش بیان ژنهای S۱۰۰A۸و S۱۰۰A۹، بر اطفال مبتلا به بیماریهای التهابی روده در موکوس رکتال و سرم گزارش شده است (۱۸). در مطالعه ای بر روی سگها، غلظت کالپروتکتین سرم هم به عنوان یک بیومارکر مناسب برای تشخیص التهاب در بیماری IBD معرفی شد ولی

[۲۳] Chemokines
[۲۴] Leach

این افزایش غلظت با ضریب فعالیت بیماری، غلظت پروتئین C راکتیو و شدت تغییرات پاتولوژیکی ارتباط نداشت (۱۹). در مطالعه دیگری بر بیماران کرون، کالپروتکتین سرم در فرم فعال بیماری بسیار بیشتر از فرم غیر فعال بوده و غلظت سرمی آن با غلظت پروتئین C راکتیو و اندکس فعالیت بیماری ارتباط مستقیم داشته است (۲۰).

در این مطالعه فراوانی ژنوتیپ های کالپروتکتین را در بیماران کولیت اولسراتیو و یا کرون بررسی شد و ارتباط آن به طور کیفی با رفتارهای مختلف بیماری (حملات بیماری، عوارض خارج روده ای ، نیاز به داروهای خط اول و دوم ، نیاز به کولکتومی وکانسر کولون) مقایسه شد.

در مطالعه توروسکایا [۲۵] و همکارانش درسال ۲۰۰۸ اثبات شد که کالپروتکتین نقش اساسی را در واکنشهای بین تومور و بافت همبند[۲۶] دارد که منجر به ایجاد سرطان کولون در زمینه کولیت می شود (۲۱). در مطالعه حاضر فقط یک نفر مبتلا به سرطان کولون بود که در بررسی های آماری ارتباط معنی داری با ژنوتیپهای کالپروتکتین مشاهده نشد.

تاکنون مطالعات بسیار کمی درمورد بررسی ارتباط واریاسیونهای ژنی کالپروتکتین وبیماریهای مختلف انجام شده است.

در سال ۲۰۰۷، لی[۲۷] و همکاران با بررسی بر ۳۲۱ نفر شامل بیماران پریودونتیت مزمن، پریودونتیت مهاجم و گروه کنترل سالم نشان دادند که ارتباط محکمی بین پلی مورفیسم ژنی کالپروتکتین و ابتلا به پریودونتیت در بیماران چینی وجود دارد (۲۲).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۹ توسط رن[۲۸] و همکاران بر ۲۰۴ نفر از ۷۳ خانواده انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها ضمن تایید مطالعه قبلی نشان داد که پلی مورفیسم تک نوکلیوتیدی rs ۳۷۹۵۳۹۱ با استعداد بیشتر ابتلا به پریودونتیت مهاجم همراه است (۲۳).

[۲۵] Turovskaya
[۲۶] Tumor stromal interactions
[۲۷] Li
[۲۸] Ren

سان[۲۹] و همکاران نیز در مطالعه ای نشان دادندکه پلی مورفیسم کالپروتکتین در استعداد ابتلا به بیماری و شدت آن نقش دارد. غلظت کالپروتکتین سرم در بیماران با پریودونتیت شدید بیشتر از کنترل بود و گزارش شد ژنوتیپ AA از ژن rs ۳۷۹۵۳۹۱ S۱۰۰A۸ در بیماران بیشتر از افراد سالم بود در حالیکه فراوانی آلل G در بیماران نسبت به کنترل کاهش نشان داد (۲۴).

مطالعه حاضر نشان داد که شایعترین ژنوتیپ کالپروتکتین در بیماری های التهابی روده ژنوتیپ TT ژن S۱۰۰A۸ و ژنوتیپ CT ژن S۱۰۰A۹ می باشد، ولی با توجه به نداشتن گروه کنترل در مطالعه حاضر، نمی توان در مورد تأثیر این پلی مورفیسم ژنی در ایجاد بیماری التهابی روده قضاوت کرد.

این مطالعه نشان داد که در مجموع تفاوت معنی داری در عوارض خارج روده ای بیماری براساس پلی مورفیسم ژنتیکی کالپروتکتین وجود ندارد. اما شایعترین عارضه خارج روده ای بیماری یعنی آرتریت (که در مطالعه حاضر نیز بیش از ۵۰ ٪ عوارض خارج روده ای را شامل می شد) به طور معنی داری با ژنوتیپ CC ژن S۱۰۰A۹ مرتبط است و بیماران مبتلا به IBD با این ژنوتیپ استعداد بیشتری از نظر ابتلا به آرتریت نشان دادند، در حالی که این عارضه با ژنوتیپهای S۱۰۰A۸ بی ارتباط بود.

همچنین در بیمارانی که به بیماری متوسط تا شدید مبتلا بودند و جهت کنترل بیماری به داروهای خط دوم (کورتیکواستروئیدها، آزاتیوپرین و ۶-مرکاپتوپورین) نیاز داشتند، شایعترین ژنوتیپ ژن S۱۰۰A ۸، TT بود و ارتباط معنی داری بین این ژنوتیپ و مصرف داروها وجود داشت؛ بنابراین بر اساس مطالعه حاضر به نظر می رسد بیمارانی که این ژنوتیپ را دارا هستند، استعداد بیشتری برای ابتلا به نوع متوسط تا شدید بیماری دارند.از طرفی تمام بیمارانی که ژنوتیپ CC ژن S۱۰۰A۹ داشتند از داروهای خط دوم استفاده می کردند، ولی این ارتباط معنی دار نبود (P=۰/۰۸). البته این نتیجه می تواند ناشی از محدودیت طرح ما و کم بودن حجم نمونه باشد.

از طرف دیگر ارتباط معنی داری بین بیمارانی که به داروهای خط سوم (نظیر اینفلیکسیماب و سیکلوسپورین) نیاز داشتند و

[۲۹] Sun

ژنوتیپهای مورد مطالعه مشاهده نشد که با توجه به اینکه این دسته از بیماران کمتر از ۱۰ ٪ بیماران مورد بررسی را تشکیل می دادند، افزایش حجم نمونه در مطالعات آینده می تواند برای رسیدن به نتیجه دقیقتر کمک کننده باشد. در مطالعه حاضر ژنوتیپ CC ژن S۱۰۰A۹ ارتباط معنی داری با بیش از ۳ حمله بیماری در سال داشت ، ولی در بیماران با کمتر از ۳ بار عود در سال ارتباط معنی داری بین حملات و پلی مورفیسم ژنی کالپروتکتین دیده نشد. این مطالعه ارتباطی بین بیماریهای پری آنال ناشی از IBD و پلی مورفیسم مورد بررسی نشان نداد.

با توجه به نداشتن گروه کنترل در این مطالعه، اگرچه نمی توان در مورد نقش پلی مورفیسم کالپروتکتین در ایجاد بیماری التهابی روده اظهار نظر کرد، ولی نتایج نشان داد که پلی مورفیسم ژنتیکی کالپروتکتین در برخی رفتار های بیماریهای التهابی روده تاثیر گذار است، چنانکه بیماران دارای ژنوتیپ CC ژن S۱۰۰A۹ بیشتر به آرتریت (به عنوان عارضه خارج روده ای بیماری) مبتلا بودند وعود های مکرر(بیش از سه بار عود در سال) در آنها شایعتر بود، درحالیکه بیماری متوسط تا شدید (که جهت کنترل بیماری نیاز به شروع داروهایی نظیر آزاتیوپورین و پردنیزولون داشت) شیوع بیشتری در بیماران با ژنوتیپ TT ژن S۱۰۰A۸ داشت، که تاکیدی است براین فرضیه که پلی مورفیسم کالپروتکتین می تواند در ایجاد تظاهرات و رفتار بیماریهای التهابی نقش داشته باشد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که پلی مورفیسم ژنتیکی کالپروتکتین می تواند در برخی رفتار های بیماریهای التهابی روده تاثیر گذار باشد. تا کنون مطالعه دیگری در مورد نقش پلی مورفیسم ژنتیکی کالپروتکتین در بیماریهای التهابی روده انجام نشده است و مطالعه حاضر اولین بررسی در مورد ارتباط آن با بیماریهای التهابی روده است. مطالعات بیشتری لازم است که اولا نقش ژنوتیپهای کالپروتکتین را در بروز بیماریهای التهابی روده نشان دهد و از طرف دیگر ارتباط آن را با شدت فعالیت بیماری و سایرویژگیهای بیماری مورد بررسی قرار دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان نامه دانشجویی فوق تخصصی به شماره ثبت ۹۲۰۲۴۰بوده که توسط دانشگاه علوم پزشکی مشهد مورد حمایت مالی قرار گرفته است. از معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که زمینه انجام پژوهش را فراهم نمودند وهمچنین از مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی زاهدان قدردانی می گردد. از بیماران محترم در شهرهای مشهد و ساری که کمال همکاری را در طول انجام مطالعه داشتند، تشکر ویژه می شود.

References:

۱. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology ۲۰۱۲; ۱٤۲: ٤٦-٥٤.

۲. Ahuja V, Tandon RK. Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. J Digest Dis ۲۰۱۰; ۱۱: ۱۳٤-۱٤۷.

۳. Safarpour AR, Hosseini SV, Mehrabani D. Epidemiology of inflammatory bowel diseases in iran and Asia; a mini review. Iran J Med Sci ۲۰۱۳; ۳۸: ۱٤۰-۱٤۹.

٤. Okou DT, Kugathasan S. Role of Genetics in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis ۲۰۱٤. In press.

٥. Ryan BM, Wolff RK, Valeri N, Khan M, Robinson D, Paone A, et al. An analysis of genetic factors related to risk of inflammatory bowel disease and colon cancer. Cancer Epidemiol ۲۰۱٤. In press.

٦. Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S۱۰۰ proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther ۲۰۰۹; ۱۱: R۳۹.

۷. Striz I, Trebichavsky I. Calprotectin a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. Physiol Res ۲۰۰٤; ٥۳: ۲٤٥-۲٥۳.

۸. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S۱۰۰A۸/S۱۰۰A۹), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. Biol Pharm Bull ۲۰۰۳; ۲۶: ۷۵۳-۷۶۰.
۹. Kajiura Y, Bando M, Inagaki Y, Nagata T, Kido JI. Glycated albumin and calprotectin levels in gingival crevicular fluid from periodontitis patients with type ۲ diabetes. J Periodontol ۲۰۱٤:۱-۲۰.
۱۰. Turina MC, Yeremenko N, Paramarta JE, De Rycke L, Baeten D. Calprotectin (S۱۰۰A۸/۹) as serum biomarker for clinical response in proof-of-concept trials in axial and peripheral spondyloarthritis. Arthritis Res Ther ۲۰۱٤; ۱٦: ٤۱۳.
۱۱. Voigtlander T, Wlecke J, Negm AA, Lenzen H, Manns MP, Lankisch TO. Calprotectin in Bile: A Disease Severity Marker in Patients With Primary Sclerosing Cholangitis. J Clin Gastroenterol ۲۰۱٤. In press.
۱۲. Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, et al. Phagocyte-specific S۱۰۰ proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. J Pathol ۲۰۰۸; ۲۱٦: ۱۸۳-۱۹۲.
۱۳. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S۱۰۰ proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. J Leukoc Biol ۲۰۰۷; ۸۱: ۲۸-۳۷.
۱٤. Tibble JA, Bjarnason I. Fecal calprotectin as an index of intestinal inflammation. Drugs Today ۲۰۰۱; ۳۷: ۸۵-۹٦.
۱٥. Yui S, Mikami M, Kitahara M, Yamazaki M. The inhibitory effect of lycorine on tumor cell apoptosis induced by polymorphonuclear leukocyte-derived calprotectin. Immunopharmacology ۱۹۹۸; ٤۰: ۱٥۱-۱٦۲.
۱٦. Rivero ERC, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SOM, Nunes FD. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Pathol Res Pract ۲۰۰٦; ۲۰۲: ٥۲۳-٥۲۹.
۱۷. Paduchova Z, Durackova Z. Fecal calprotectin as a promising marker of inflammatory diseases. Bratisl Lek Listy ۲۰۰۹; ۱۱۰: ٥۹۸-٦۰۲.
۱۸. Leach ST, Yang Z, Messina I, Song C, Geczy CL, Cunningham AM, et al. Serum and mucosal S۱۰۰ proteins, calprotectin (S۱۰۰A۸/S۱۰۰A۹) and S۱۰۰A۱۲, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol ۲۰۰۷; ٤۲: ۱۳۲۱-۱۳۳۱.
۱۹. Grellet A, Heilmann RM, Lecoindre P, Feugier A, Day MJ, Peeters D, et al. Fecal calprotectin concentrations in adult dogs with chronic diarrhea. Am J Vet Res ۲۰۱۳; ۷٤: ۷۰٦-۷۱۱.
۲۰. Meuwis MA, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, Laharie D, Piver E, et al. Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease. J Crohns Colitis ۲۰۱۳; ۷: e٦۷۸-e۸۳.
۲۱. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, et al. RAGE, carboxylated glycans and S۱۰۰A۸/A۹ play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. Carcinogenesis ۲۰۰۸; ۲۹: ۲۰۳٥-۲۰٤۳.
۲۲. Li Q, Meng H, Zhang L, Xu L, Chen Z, Shi D, et al. Correlation between single nucleotide polymorphisms in a calprotectin subunit gene and risk of periodontitis in a Chinese population. Ann Hum Genet ۲۰۰۷; ۷۱: ۳۱۲-۳۲٤.
۲۳. Ren XY, Xu L, Meng HX, Zhao HS, Lu RF, Chen ZB, et al. Family-based association analysis of S۱۰۰A۸ genetic polymorphisms with aggressive periodontitis. J Periodontal Res ۲۰۰۹; ٤٤: ۱۸٤-۱۹۲.
۲٤. Sun X, Meng H, Shi D, Xu L, Zhang L, Chen Z, et al. Analysis of plasma calprotectin and polymorphisms of S۱۰۰A۸ in patients with aggressive periodontitis. J Periodontal Res ۲۰۱۱; ٤٦: ۳٥٤-۳٦۰.