

مقاله اصلی

بررسی رابطه پلی مورفیسم ژنی کالپروتکتین و بیماریهای التهابی روده

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۰

خلاصه

مقدمه

کالپروتکتین یک مدیاتور التهابی مهم در بیماریهای التهابی روده می باشد و از دو ساب یونیت S100A9 و S100A8 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 بیمار دچار کولیت اولسراتیو یا 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 rs38۰۶۲۳۲ از ژن S100A8 و rs3۰۱۴۸۶۶C/T از ژن S100A9، به روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (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، کلاتریت اسکروزان، عوارض پوستی و چشمی)، دیس پلازی و سرطان کولون مقایسه گردید.

نتایج

شایعترین ژنوتیپ S100A9 در بیماران، CT و شایعترین ژنوتیپ S100A8، TT بود ($P < ۰/۰۵$). اکثر بیماران مبتلا به آرتریت دارای ژنوتیپ CC از S100A9 بودند و ارتباط بین این ژنوتیپ و آرتریت معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$). اختلاف معنی داری بین سن، جنس، مدت زمان، وسعت درگیری و ابتلا به سایر تظاهرات خارج روده ای و ژنوتیپ کالپروتکتین مشاهده نشد. ژنوتیپ TT از S100A8 ارتباط معنی داری در بیماریاری داشت که برای کنترل بیماری، درمانهای خط دوم شامل کورتیکواستروئیدها و آزانثیوپرین را دریافت کرده بودند ($P < ۰/۰۵$). در بررسی ها گرچه ارتباط معنی داری بین بیماران با ۱ تا ۲ بار حملات بیماری در سال و ژنوتیپ کالپروتکتین دیده نشد، در ۱۰ بیمار که در سال گذشته حداقل ۳ بار دچار عود بیماری شده بودند، ژنوتیپ CC از S100A9 شایعتر از سایر ژنوتیپها بود ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان می دهد که پلی مورفیسم ژنتیکی کالپروتکتین می تواند در برخی رفتارهای بیماریهای التهابی روده از جمله شدت بیماری (بر اساس 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 سایر ویژگیهای 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 منافی وجود ندارد.

۱ مهدی مولوی

۲ حافظ فاختی*

۳ علی بهاری

۴ حسن وثوقی نیا

۵ زهره باری

۶ عباس اسماعیل زاده

۷ آرزینا گنجی

۸ محمد هاشمی

۹ محمد خواجه دلویی

۱۰ غلامرضا بهاری

۱۱ بهاره امین

۱۲ کامران غفارزادگان

۱- استادیار گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۲- استادیار گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی ساری، ساری، ایران

۳- دانشیار گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- دستیار فوق تخصصی گوارش و کبد، دانشکده پزشکی،

دانشگاه علوم پزشکی ساری، ساری، ایران

۵- استادیار گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۶- استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۷- دانشیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی،

دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۸- مربی بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

زاهدان، زاهدان، ایران

۹- استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۱۰- کلبیکال پاتولوژیست، بیمارستان رضوی، مشهد، ایران*

ساری- دانشگاه علوم پزشکی مازندران- مرکز تحقیقات

بیماریهای التهابی گوارش فوقانی، مازندران، ایران

تلفن: ۴-۲۲۶۱۷۰۱-۹۸

email:fakher42@yahoo.com

مقدمه

شیوع بیماریهای التهابی روده^۱ (IBD) در سالهای اخیر افزایش چشمگیری داشته است (۱، ۲). 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 نیز با 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 ایمنونولوژیک متعددی دخیل هستند، یکی از این عوامل پروتئین کالپروتکتین است که نقش آن در روندهای التهابی اثبات شده است (۴-۶). کالپروتکتین مجموعه ای از دو هترودایمر سبک S100A8 و سنگین S100A9 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، پریدونیت، سیستمیک فیبروزیس، کلاتریت اسکروزان و بیماریهای التهابی روده مثل کرون و کولیت اولسراتیو شناخته می شود (۷-۱۱). کالپروتکتین پپتیدی با ویژگیهای منحصر بفرد است که از طریق القای تولید نیتریک اکسید^۲ (NO) و تحریک ایمنی ذاتی، کموتاکسی، تنظیم فعالیت آنزیم^۳ (NOX2) در فاگوسیتوز و اثرات باکتریوستاتیک بر باکتریهای 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 (۱۲، ۱۳). بنابراین تظاهرات و رفتار بیماری های التهابی نظیر بیماریهای التهابی روده ممکن است با میزان فعالیت و خصوصیات این مدیاتورهای التهابی و تفاوت های کمی و کیفی

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 علائم و عوارض بیماری های التهابی از جمله IBD مؤثر باشد (۱۴، ۱۵). با توجه به تفاوت رفتار بیماریهای التهابی روده در جمعیت های مختلف و نقش مهم کالپروتکتین در بروز التهاب و عوارض آن، این مطالعه با هدف بررسی فراوانی پلی مورفیسمهای ژنتیکی کالپروتکتین در این 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 نفر تعیین شد. این مطالعه بر روی نمونه های جمع آوری شده بیماران از شهرهای مشهد و ساری سالهای بین ۹۲-۹۳ انجام گرفت. بیماران 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 اندوسکوپی 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، کلاتریت اسکروزان اولیه، عوارض چشمی و عوارض 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 rs3806232 از ژن 8 S100A و rs3014866 C/T از ژن

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

درجه سانتیگراد تا زمان انجام PCR نگهداری کرد (تمامی مواد و معرفهای به کار رفته از شرکت مرک آلمان تهیه شده بودند). پرایمرهای به کار رفته برای سه جایگاه و اندازه محصولات هریک به شرح زیر می باشد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی ژنوتیپ

اندازه	توالی پرایمرها) ۳-۵)	ژنها
۲۵۷ bp ^{۱۶}	Forward: ACATCCCTGAAACTGAATTG	S1۰۰A
	Reverse (C allele):	
	AGGAATGGATATAGCCCTTGGAG	
	Reverse (T allele):	
۳۲۴ bp	Forward: CAGGTGCATCTCAGCAGTGT	S1۰۰A۹
	Reverse (T allele):	
	CGGGGCTTGGCAATAGA	
	Reverse (C allele):	
	CGGGGCTTGGCAATAGG	rs۳۰۱۴۸۶۶

برای انجام PCR به ازای هر نمونه ۸ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر ماستر میکس واز هریک از پرایمرها ۵/۵ میکرولیتر افزوده و ۱۹ میکرولیتر از مخلوط را به میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری منتقل و به آن ۱ میکرولیتر DNA اضافه کرده و PCR با شرایط زیر انجام شد. ۱-۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه. ۲-۹۵ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه. ۳-۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه. ۴-۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه. مراحل ۲ لغایت ۴ به تعداد ۳۰ سیکل تکرار و سپس ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و در انتها، ۱۵-۶ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ ثانیه 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 Labnet ۳۰۰ قرار داده و ژل مربوطه را با دستگاه ژل داک (کیمیازن) خوانده و ژنوتیپ 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} اسکوائر استفاده شد. ارزش احتمال (P Value)^{۲۲} کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

به روش^{۱۸} 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 مدت ۱ ماه از زمان نمونه گیری جهت تخلیص DNA ارسال شد (۱۶). به این منظور ۵۰۰ میکرولیتر خون تام حاوی^{۱۹} EDTA، به ۸۰۰ میکرولیتر بافر شماره ۱ شامل ۱/۵۷ گرم^{۲۰} تریس هیدروکلریک اسید، ۱۱۰ گرم ساکارز، ۱/۰۱ گرم^{۲۱} منیزیم کلرید و ۱۰ میلی لیتر تریتون^{۲۲} (به منظور هضم غشاء لیبیدی) در یک لیتر محلول آبی به منظور لیز کردن RBC ها اضافه شد. مخلوط فوق در دور ۷۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده، محلول رویی را دور ریخته و این عمل یکبار دیگر بمنظور ازین بردن باقیمانده RBC ها تکرار شد. مجدداً محلول رویی را دور ریخته به باقیمانده که یک رسوب شیری رنگ حاوی گلبولهای سفید خون^{۲۳} (WBC) بوده، ۴۰۰ میکرولیتر بافر شماره ۲ (حاوی ۱/۵۷ گرم Tris HCl و ۳/۷۵ گرم EDTA و ۶۰ میکرولیتر ۱۰٪ SDS در یک لیتر محلول آبی) اضافه و مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

به محلول مرحله قبل ۱۵۰ میکرولیتر محلول^{۲۴} کلرید سدیم اشباع و ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه نموده و رتکس کرده و در دور ۵۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی را با سمپلر به میکرو تیوب دیگری منتقل کرده و به آن ۸۰۰ میکرولیتر پروپانول سرد اضافه کرده در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یکساعت قرار داده تا کلاف DNA تشکیل شود. سپس در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کرده، به رسوب، ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده و در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ تکرار شد. رسوب به دست آمده را به مدت ۲۰ دقیقه در آنکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد آنکوبه کرده تا تمامی الکل تبخیر شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به رسوب اضافه نموده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری می کنیم. این DNA را می توان در دمای ۲۴-

^{۱۸} Polymerase Chain Reaction

^{۱۹} Ethylenediaminetetraacetic acid

^{۲۰} Tris Hydrochloric acid (Tris HCL)

^{۲۱} MgCl_۲

^{۲۲} Triton

^{۲۳} White Blood Cell

^{۲۴} Sodium Dodecyl Sulphate

^{۲۵} NaCl

^{۱۶} Basic pairs

^{۱۷} Thermal cycler

^{۱۸} Statistical Package for the Social Sciences

^{۱۹} Analysis of Variance (ANOVA)

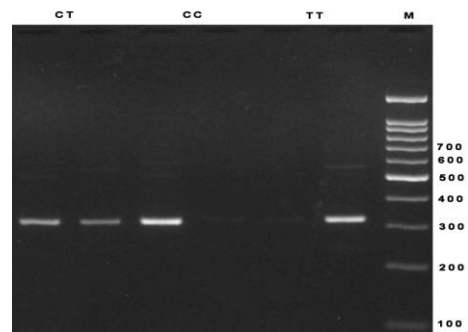
^{۲۰} Tukey's HSD

^{۲۱} Pearson Chi-Square

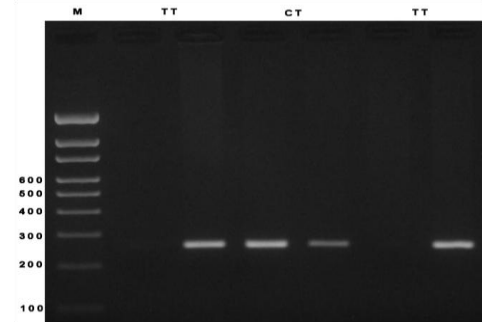
^{۲۲} Probability Value

نتایج

از تعداد ۱۷۰ بیمار مورد مطالعه، ۱۶۶ نفر شرایط مطلوب را داشته و در مطالعه باقی ماندند و ۱ نفر به علت ابتلا به لوپوس اریتماتوس، ۲ نفر مبتلا به دیابت تیپ ۱ و ۱ نفر 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 و ۳۴ بیمار کرون داشتند. ژنوتیپ های به دست آمده در شکل ۱ و ۲ قابل مشاهده می باشد.



شکل ۱- تصویر نتایج مربوط به الکتروفورز پلی مورفیسم rs3014866 ژن S100A9 بر روی ژل آگارز ۲ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بر مایده. ستون ۱ (M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲، ۳ نمونه هموزیگوت با ژنوتیپ TT و ستون شماره ۴ و ۵ نمونه هموزیگوت با ژنوتیپ CC و ستون ۶ و ۷ نمونه هتروزیگوت با ژنوتیپ CT را نشان می دهد (اندازه باند ۳۲۴ bp).



شکل ۲- تصویر نتایج مربوط به الکتروفورز پلی مورفیسم rs3806232 ژن S100A8 بر روی ژل آگارز ۲ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بر مایده. ستون ۱ (M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲، ۳ نمونه هموزیگوت با ژنوتیپ TT و ستون شماره ۴ و ۵ نمونه هتروزیگوت با ژنوتیپ CT را نشان می دهد (اندازه باند ۳۲۴ bp).

ژنوتیپ CT و ستون شماره ۶ و ۷ نمونه هموزیگوت با ژنوتیپ TT را نشان می دهد (اندازه باند ۲۵۷ bp).

همانطور که در شکل ۱ نشان داده می شود، پیتید تک نوکلئوتیدی rs3014866 ژن S100A9 فرمهای هموزیگوت TT، CC و فرم هتروزیگوت CT را نشان می دهد. در حالیکه پیتید تک نوکلئوتیدی rs3806232 ژن S100A8، ژنوتیپ CC ندارد و ژنوتیپ به فرمهای هموزیگوت TT و هتروزیگوت CT دیده می شود (شکل ۲). مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. شایعترین ژنوتیپ S100A9 در بیماران مورد مطالعه CT و شایعترین ژنوتیپ S100A8 در بیماران مورد مطالعه ژنوتیپ TT بود ($P < 0.05$). 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 آرتريت با ۱۸ نفر، کلاژیت اسکروزان 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 آرتريت و ژنوتیپ های S100A8 دیده نشد؛ در حالیکه اکثر بیماران مبتلا به آرتريت دارای ژنوتیپ CC از S100A9 بودند و ارتباط بین این ژنوتیپ و آرتريت معنی دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپ های بدست آمده ژن S100A9 و

S100A8		
ژن	ژنوتیپ	فراکانس (درصد)
S100A9 (۳۲۴)	CC	۳۱ (۱۸.۷٪)
	CT*	۱۱۱ (۶۶.۹٪)
	TT	۲۴ (۱۴.۵٪)
S100A8 (۲۵۷)	CT	۳۲ (۱۹.۳٪)
	TT*	۱۳۴ (۸۰.۷٪)

* $P < 0.05$ در مقایسه ژنوتیپها با هم بر اساس آزمون آماری آنوا و تست

تعقیبی Tukey's

جدول ۳- ارتباط بین پلی مورفیسم ژنی S100A9 و S100A8 و متغیرهای مورد مطالعه در بیماران کولیت اولسراتیو و کرون

متغیرهای مختلف

شدت بیماری (بر اساس داروی کانسر کولون دیس پلازی تظاهرات خارج روده ای عود بیماری در عود بیماری در عود بیماری پلی مورفیسم

تجویز شده)										
طی ۳ سال										
طی ۲ سال										
در طی اسال										
ژنی										
کلازیت										
اسکلروز دهنده										
آرتزیت										
درگیری چشم/پوست										
نکروزان										
داروی خط سوم										
داروی خط دوم										
۰/۴۵P =	۰/۰۱P <	۰/۷P =	۰/۵P =	۰/۸۷P =	۰/۹P =	۰/۲P =	۰/۱۵P =	۰/۲P =	۰/۵۳P =	۸S۱۰۰A
۰/۸۹P =	۰/۰۸P =	۰/۳P =	۰/۶۵P =	۰/۳۲P =	۰/۴۶P =	۰/۰۱P <	۰/۰۲P =	۰/۷P =	۰/۱P =	S۱۰۰A۹

جدول ۴- ارتباط بین پلی مورفیسم ژنی ۸ S۱۰۰A و ۹ S۱۰۰A 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	ایلنوژوژنیت	ایلنوکلوت	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

سایر ژنوتیپها بود ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۳). 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 (جدول ۴).

بحث

کالپروتکتین پپتیدی با ویژگیهای منحصر بفرد است و به 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 و افزایش 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 S۱۰۰A۸ و 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

شایعترین ژنوتیپ بیماران مبتلا به کلازیت اسکلروزان اولیه در ژنهای S۱۰۰A۸ و S۱۰۰A۹ به ترتیب TT و CT بود ولی اختلاف معنی داری بین ابتلا به کلازیت اسکلروزان اولیه و ژنوتیپ کالپروتکتین مشاهده نشد. همچنین اختلاف بین شیوع سایر تظاهرات خارج روده ای بیماران شامل تظاهرات پوستی و چشمی و ژنوتیپهای 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 بار حملات بیماری در سال و ژنوتیپ کالپروتکتین دیده نشد، در ۱۰ بیمار که در سال گذشته حداقل ۳ بار عود بیماری داشته اند، ژنوتیپ CC ژن S۱۰۰A۹ بطور معنی داری شایعتر از

^{۲۳} Chemokines

^{۲۴} Leach

سان^{۲۹} و همکاران نیز در مطالعه ای نشان دادند که پلی مورفیسم کالپروتکتین در استعداد ابتلا به بیماری و شدت آن نقش دارد. غلظت کالپروتکتین سرم در بیماران با پریدونیت شدید بیشتر از کنترل بود و گزارش شد ژنوتیپ AA از ژن ۳۷۹۵۳۹۱ IS S1۰۰A۸ 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 S1۰۰A۸ و ژنوتیپ CT ژن S1۰۰A۹ 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 آرتريت (که در مطالعه حاضر نیز بیش از ۵۰٪ عوارض خارج روده ای را شامل می شد) به طور معنی داری با ژنوتیپ CC ژن S1۰۰A۹ مرتبط است و بیماران مبتلا به IBD با این ژنوتیپ استعداد بیشتری از نظر ابتلا به آرتريت نشان دادند، در حالی که این عارضه با ژنوتیپهای S1۰۰A۸ 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 S1۰۰A۸، 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 S1۰۰A۹ 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

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 و کانسر کولون) مقایسه شد.

در مطالعه توروسکایا^{۲۵} و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثبات شد که کالپروتکتین نقش اساسی را در واکنش های 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 در مورد بررسی ارتباط واریاسیونهای ژنی کالپروتکتین و بیماریهای مختلف انجام شده است.

در سال ۲۰۰۷، لی^{۲۷} و همکاران با بررسی بر ۳۲۱ نفر شامل بیماران پریدونیت مزمن، پریدونیت مهاجم و گروه کنترل سالم نشان دادند که ارتباط محکمی بین پلی مورفیسم ژنی کالپروتکتین و ابتلا به پریدونیت 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 نوکلئوتیدی ۳۷۹۵۳۹۱ IS با استعداد بیشتر ابتلا به پریدونیت مهاجم همراه است (۲۳).

^{۲۵} Turovskaya

^{۲۶} Tumor stromal interactions

^{۲۷} Li

^{۲۸} Ren

نتیجه گیری

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

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان نامه دانشجویی فوق تخصصی به شماره ثبت ۹۲۰۲۴۰ بوده 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 و همچنین 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.

ژنوتیپ های 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 S100A9 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 بیماری های 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 بیماری های التهابی روده تاثیر گذار است، چنانکه بیماران دارای ژنوتیپ CC ژن S100A9 بیشتر به آتریت (به عنوان عارضه خارج روده ای بیماری) مبتلا بودند و عود 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 داروهای نظیر آزاتیوپورین و پردنیزولون داشت) شیوع بیشتری در بیماران با ژنوتیپ TT ژن S100A8 داشت، که تاکید است براین فرضیه که پلی مورفیسم کالپروتکتین می تواند در ایجاد تظاهرات و رفتار بیماری های التهابی نقش داشته باشد.

References:

1. 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; ۱۴۲: ۴۶-۵۴.
2. 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: ۱۳۴-۱۴۷.
3. Safarpour AR, Hosseini SV, Mehrabani D. Epidemiology of inflammatory bowel diseases in iran and Asia; a mini review. *Iran J Med Sci* ۲۰۱۳; ۳۸: ۱۴۰-۱۴۹.
4. Okou DT, Kugathasan S. Role of Genetics in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* ۲۰۱۴. In press.
5. 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* ۲۰۱۴. In press.
6. Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* ۲۰۰۹; ۱۱: R۳۹.
7. Striz I, Trebichavsky I. Calprotectin a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* ۲۰۰۴; ۵۳: ۲۴۵-۲۵۳.

۸. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), 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* ۲۰۱۴: ۱-۲۰.
۱۰. Turina MC, Yeremenko N, Paramarta JE, De Rycke L, Baeten D. Calprotectin (S100A8/9) as serum biomarker for clinical response in proof-of-concept trials in axial and peripheral spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* ۲۰۱۴; ۱۶: ۴۱۳.
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* ۲۰۱۴. In press.
۱۲. Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, et al. Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol* ۲۰۰۸; ۲۱۶: ۱۸۳-۱۹۲.
۱۳. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* ۲۰۰۷; ۸۱: ۲۸-۳۷.
۱۴. Tibble JA, Bjarnason I. Fecal calprotectin as an index of intestinal inflammation. *Drugs Today* ۲۰۰۱; ۳۷: ۸۵-۹۶.
۱۵. 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; ۴۰: ۱۵۱-۱۶۲.
۱۶. 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* ۲۰۰۶; ۲۰۲: ۵۲۳-۵۲۹.
۱۷. Paduchova Z, Durackova Z. Fecal calprotectin as a promising marker of inflammatory diseases. *Bratisl Lek Listy* ۲۰۰۹; ۱۱۰: ۵۹۸-۶۰۲.
۱۸. Leach ST, Yang Z, Messina I, Song C, Geczy CL, Cunningham AM, et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* ۲۰۰۷; ۴۲: 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; ۷۴: ۷۰۶-۷۱۱.
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: e۶۷۸-e۸۳.
۲۱. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, et al. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis* ۲۰۰۸; ۲۹: ۲۰۳۵-۲۰۴۳.
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: ۳۱۲-۳۲۴.
۲۳. Ren XY, Xu L, Meng HX, Zhao HS, Lu RF, Chen ZB, et al. Family-based association analysis of S100A8 genetic polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* ۲۰۰۹; ۴۴: ۱۸۴-۱۹۲.
۲۴. Sun X, Meng H, Shi D, Xu L, Zhang L, Chen Z, et al. Analysis of plasma calprotectin and polymorphisms of S100A8 in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* ۲۰۱۱; ۴۶: ۳۵۴-۳۶۰.