Archive of SID

مقاله پژوهشی

بررسی پلی مورفیسم C-2518T ژن CCL2 در مبتلایان به بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولا از منطقه ی شمال غرب ایران

طاهره محمدیان*، دکتر مرتضی بنیادی**، دکتر علیرضا جوادزاده***، دکتر محمدحسین جبارپور بنیادی****

دریافت: ۹۳/۱۰/۸ پذیرش: ۹۴/۲/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: دژنراسیون وابسته به سن ماکولا (AMD) بیماریی است که نواحی مرکزی رتینا و کروئید را تحت تاثیر قرار می دهد و میتواند منجر به از دست رفتن بینایی شود. مطالعات در زمینه اتیولوژی این بیماری پیشنهاد می کند که AMD یک بیماری پیچیده می باشد که در اثر واکنش ها و میانکنش های چندین ژن و عوامل محیطی ایجاد می شود. مطالعات بسیاری بر روی نقش سایتوکاین های کموتاکسیک که کموکاین هم نامیده می شود تمرکز کرده است. کموکاین های خاصی مثل CCL2 به نظر میرسد که در ایجاد دژنراسیون رتینا و رگ زایی کوروئیدی مهم باشند. به منظور تعیین ارتباط بین واریانت های ژن CCL2 با بیماریAMD به مطالعه ی پلی مورفیسم C-۲۵۱۸T در این ژن پرداخته شد

روش کار: در این مطالعه ی مورد- شاهدی ارتباط پلی مورفیسمC -۲۵۱۸T- در منطقه پروموتری ژن CCL2 در ۶۰ بیمار مبتلا به AMD و ۵۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل که از نظر جنس، سن و قومیت با گروه بیمار تطابق داشتند مورد بررسی قرار گرفت. هر دو گروه بیمار و کنترل از منطقه ی شمال غرب ایران بودند. ژنوتیپ آنها با واکنش زنجیره ای پلیمراز و چندشکلی طول قطعات هضم شونده تعیین شد.

نتایج: آنالیزهای آماری فرکانس بالای ژنوتیپ TT و آلل T در بیماران دژنراسیون وابسته به سن ماکولا را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد اگرچه تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود.

نتیجه نهایی: علی رغم تفاوت اندکی که بین گروه شاهد و کنترل بود آنالیزهای آماری در ژن CCL2 هیچ گونه ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسمC -۲۵۱۸T- و بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولا نشان نداد.

کلید واژه ها: استحاله ماکولا / پلی مورفیسم / ژن CCL2

مقدمه:

دژنراسیون وابسته به سن ماکولا (Age-related Macular Degeneration; AMD) یکی از علل اختلال بینایی در دوران پیری می باشد. مراحل اولیه بیماری با تشکیل رسوب هایی در زیر شبکیه به نام دروزن همراه است که به مرور آتروفی یا خشکی شدید در ناحیه ماکولا ایجاد میشود وهمزمان با پیشرفت بیماری رگ زایی، ایجاد زخم و خونریزی در ناحیه زیر شبکیه اتفاق می افتد. درصورتیکه AMD به مرحله پیشرفته و رگ زایی برسد می تواند شدیدا باعث تضعیف دید مرکزی بیمار و نهایتاً کوری گردد (۱).

فاکتورهایی که می تواند در ایجاد بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولا نقش داشته باشند عبارتند از: سن، نژاد، رژیم غذایی، مصرف دخانیات و چاقی. از آنجاییکه نقش دخالت شماری از ژن ها در استعداد ابتلا به این بیماری در افراد مشاهده شده است این بیماری یک بیماری پلی ژنیک محسوب میشود (۲).

بنظر میرسد که التهاب در بیماری زایی بیماری AMD

* کارشناسی ارشد ژنتیک، قطب علمی تنوع زیستی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز

** دانشیار ژنتیک پزشکی، قطب علمی تنوع زیستی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز (jabbarpour@tabrizu.ac.ir)

*** استاد گروه چشم پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

**** چشم پزشک، مرکز تحقیقات چشم پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

www.SID.ir

Archive of SID

نقش مهمی داشته و مطالعات مختلف در سالهای اخیر موید نقش التهاب در بروز و پیشرفت این بیماری است. تشکیل دروزن ها در این بیماری که حاوی اجزای مربوط به سیستم ایمنی و التهابی بوده و همچنین مشاهده سلول های التهابی مزمن در سطح خارجی غشای برونژ در مواردی که رگ زایی اتفاق می افتد تاثیر التهاب در این بیماری را تایید می کنند (۶-۳). بر همین اساس ژن های مربوط به سیستم ایمنی و التهابی در رابطه با بیماری AMD بسیار مورد مطالعه قرار گرفته اند که از جمله ی آنها ژن CFH (کد کننده ی فاکتور کمپلمان FB (H و C2 را میتوان نام برد (۷).

کموکاین ها از جمله مولکول هایی هستند که نقش آنها در بروز التهاب در بیماری های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. کموکاین ها عضوی از خانواده سایتوکاین ها می‌باشند که نقش های مهمی در رشد و نمو جنین، ایجاد و بقای ایمنی ذاتی و اکتسابی دارند. به علاوه این مولکول ها نقش مهمی را در التیام زخم و آنژیوژنز، التهاب های مزمن، تومور زایی، متاستاز و بیماری های مربوط به سیستم ایمنی بر عهده دارند (۸).

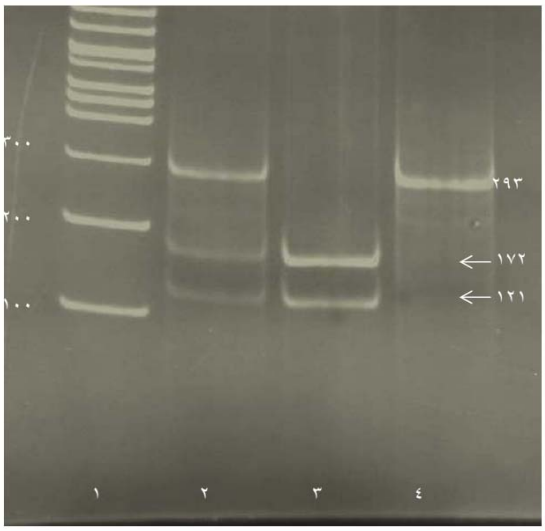
CCL2 عضوی از خانواده ی کموکاین های CC همراه با رسپتور خود CCR2 رگ زایی را در سلول های اندوتلیال میانجیگری می کند. مطالعات نشان داده است که پلی مورفیسم C/T در جایگاه پروموتری ۲۵۱۸- ژن CCL2 (NC_000017) میتواند میزان این کموکاین را تحت تاثیر قرار دهد (۹).

هدف این مطالعه مقایسه فراوانی پلی مورفیسم ژن مذکور در دو گروه بیمار و شاهد و بررسی همراهی احتمالی پلی مورفیسم پروموتریT C-۲۵۱۸ ژن CCL2 بر استعداد ابتلا به بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولادر منطقه ی شمال غرب ایران می باشد.

روش کار:

دراین مطالعه ی مورد- شاهدی ۱۱۰ نفر مورد بررسی ژنتیکی در جایگاه پلی مورفیسم ۲۵۱۸- در ژن CCL2 قرار گرفتند. از این تعداد ۶۰ نفر مبتلا به بیماری AMD بودند که توسط متخصص چشم پزشکی به مرکز ژنتیک معرفی شده بودند. گروه کنترل را ۵۰ نفر بزرگسال بدون سابقه یا ابتلا به بیماری های التهابی، ایمنولوژیکی تشکیل میدادند. هردوگروه کنترل و بیمار از جمعیت شمال غرب ایران بودند. از هر دو گروه بیمار و کنترل پس از تکمیل فرم رضایت، خونگیری شد.

DNA ژنومی از خون افراد با استفاده از پروتکل استاندارد استخراج DNA (نمک اشباع) استخراج گردید (۱۰). DNA استخراج شده با استفاده از روش PCR (دستگاه ترموسایکل ABI 22500) تکثیر و با استفاده از روش RFLP-PCR ژنوتیپ افراد در جایگاه ۲۵۱۸- تعیین گردید. . پرایمرهای مورد استفاده شامل پرایمر پیشرو 5` G GGAACTTCCA AAGCTGCCT 3` و پرایمر پیرو 5` AG CTTTGCTGGC TGAGTGTT 3` می‌باشد که پس از طراحی از شرکت ژن فن آوران سفارش و خریداری گردید. آنزیم محدودگر PvuII (شرکت فرمنتاز، کشور آلمان) برای هضم آنزیمی استفاده گردید که همراه با بافر مخصوص آنزیم و محصولات PCR به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بنماری نگهداری شدند. محصولات هضم آنزیمی شده PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکترو فورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در نور UV مشاهده شدند. آنزیم PvuII زمانی که آلل C در این جایگاه وجود دارد برش را انجام می دهد و دو قطعه ی ۱۲۱ بازی و ۱۷۲ بازی را تولید می کند. بنابراین، در نمونه های با ژنوتیپ CC دو باند و در ژنوتیپ TC سه باند ۲۹۳، ۱۲۱و۱۷۲بازی مشاهده شد (شکل۱).



شکل ۱: محصولات RFLP-PCR پلی مورفیسم C-۲۵۱۸ T ژن CCL2

۱: مارکر ۲: ژنوتیپ CT (دو باند ۱۷۲و ۱۲۱ باندی که نشاندهنده ی هضم یکی از رشته ها توسط آنزیم PvuII می باشد و باند ۲۹۳ بازی هضم نشده در رشته ی دیگر) ۳: ژنوتیپ CC (آنزیم هر دو رشته را در جایگاه آلل C برش داده است) ۴: ژنوتیپ TT (هیچیک از رشته ها دچار هضم آنزیمی نشده‌است)

www.SID.ir

Archive of SID

برای اطمینان ازصحت نتایج بـه دسـت آمـده از روش RFLP تعـــدادی ازمحـــصولات بـــا اســـتفاده از روش sequencing (شرکت ماکروژن، کره جنوبی) تـوالی یـابی شدند (شکل ۲). نتایج به دست آمده از توالی یـابی نتـایج مربوط به RFLP را تایید نمود به طوریکه نمونه هایی کـه توسط آنزیم هضم شده بودند در جایگـاه مربـوط بـه پلـی مورفیسم C-۲۵۱۸T آلل C را نشان می دهد.

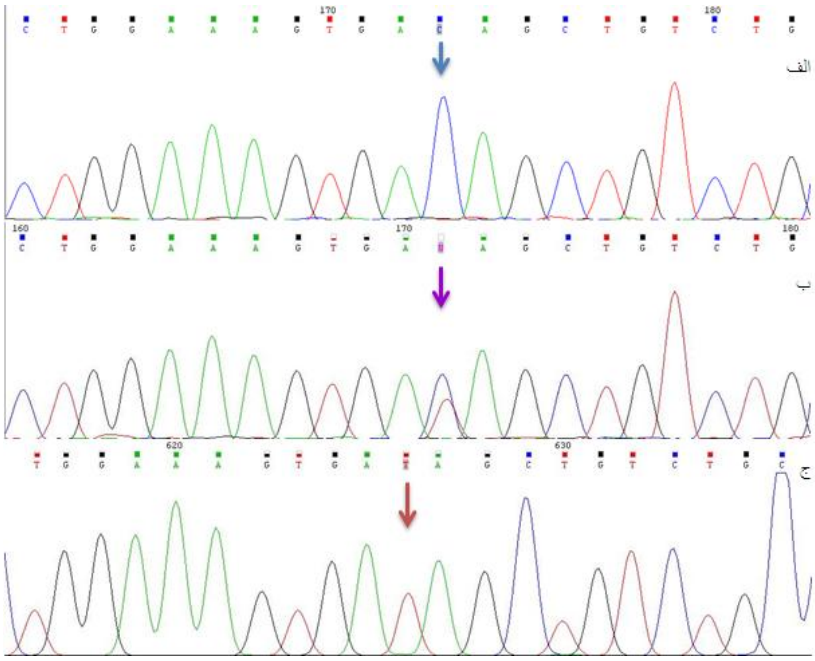
تفاوت های ژنوتیپی و آللی موجود در میان گروه بیمار و کنترل با اسـتفاده از آزمـون فیـشر و مجـذورکای مـورد بررسی قرار گرفت. P کمتر از ۰/۰۵ به صورت معنی دار در نظر گرفته شده است.

نتایج:

برای بررسی پلی‌مورفیسم C-2518T در ژن AMD، ۶۰ فرد مبتلا به بیماری AMD و ۵۰ نفر سالم به عنوان گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفتند. طیف سـنی افـراد مبـتلا ۷۴/۴۲ سال بود. ازمیان بیماران۲۴ نفر آن ها زن و ۳۶ نفر مرد بودند هیچ گونه ارتبـاط معنـی داری از لحـاظ سـن و جنس در بیماران مشاهده نگردیـد. توزیـع ژنـوتیپی بـین گروه کنترل و بیمار بررسـی شـده و مـشاهده گردیـد کـه فرکانس TT در گروه بیماران در مقایسه با گروه کنترل بالا می باشد (۵۵ درصد در مقایسه بـا ۴۴ درصـد) ولـی ایـن میزان از لحاظ آمار معنی دار نبـود (P=۰/۰۷۹). فرکـانس ژنوتیپ TC در گروه بیمار ۳۳/۳۳ درصد میباشد درحالیکه این مقـدار در گـروه کنتـرل ۲۲ درصـد اسـت و میـزان P محاسبه شده برای این ژنوتیپ ۰/۰۶۷ میباشد کـه معنـی دار نیست. مقدار فرکانس ژنوتیـپ CC در گـروه کنتـرل و بیمار تقریبا یکسانی به دست آمد (۱۱/۶۶ درصد در گـروه بیمار و ۱۲ درصد در گروه کنترل) که مقدار معنی داری از نظر آماری نشان نمی دهد. نتایج حاصـل از بررسـی هـای آللـی میـزان بـالای آلـل T را در گـروه بیمـار نـشان داد (۸۶ درصد در مقایسه با ۶۶ درصد) که ایـن مقـدار نیـز از لحاظ آماری معنی دار نبود (P=۰/۲۳۸) نتـایج بـه دسـت آمده از آنالیزهای آماری در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: توزیع ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسمC-۲۵۱۸T بین گروه کنترل و بیمار

	بیمار (n=۶۰)		کنترل (n=۵۰۰)		درصد شانس	ارزشP
	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
ژنوتیپ						
TT	۳۳	۸۵	۲۲	۴۴	۱/۵۵۶	۰/۰۷۹
TC	۲۰	۳۳/۳۳	۲۲	۴۴	۰/۶۳۶	۰/۰۶۷
CC	۷	۱۱/۶۶	۶	۱۲	۰/۹۶۸	۰/۴
آلل ها						
T	۸۶	۷۱/۶۷	۶۶	۶۶	۱/۳۰۳	۰/۲۳۸
C	۳۴	۲۸/۳۳	۳۴	۳۴	۰/۷۶۷	۰/۲۰۸



شکل۲: نتایج حاصل از توالی یابی ژن CCL2 در جایگاه ۲۵۱۸-

نوکلئوتید C با پیک به رنگ آبی ، نوکلئوتید T به رنگ قرمز، نوکلئوتید G به رنگ مشکی و نوکلئوتید A به رنگ سبز مشخص شده است. الف) سکانس از افراد حامل ژنوتیپ CC ب) ژنوتیپ TC (هم آلل Tو هم آلل Cمشاهده میشودپ) و ج)ژنوتیپ TT

www.SID.ir

Archive of SID

بحث:

تحلیل ماکولای وابسته به سن یکی از علل شایع نابینایی در افراد مسن میباشد که علت اصلی بروز بیماری تاکنون مشخص نشده است. نقش تنوعات ژنتیکی در بیماری AMD به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است اگرچه ارتباط مستقیم بین بروز بیماری و موتاسیون در ژن های مسئول دیستروفی های ماکولا تنها در موارد کمی گزارش شده است (۱۱،۱۲).

اخیرا پلی مورفیسم Y402H در فاکتور H سیستم کمپلمان در ارتباط با بیماری AMD گزارش شده است. به علاوه هاپلوتایپ های مخصوصی در فاکتورهای B/C2 در ارتباط با این بیماری دیده شده است (۱۳).

نقش ژن های پیش التهابی از جمله سایتوکاین ها و کموکاین ها نیز در این بیماری به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. سایتو کاین ها و کموکاین ها پروتئین های محلولی هستند که بسیاری از پروسه های بیولوژیکی را از جمله پاسخ های ایمنولوژیکی و التهابی را تنظیم میکنند از این رو تنظیم نادرست سایتوکاین های پیش التهابی و ضد التهابی میتواند منجر به بیماری های التهابی شود (۱۴).

از میان ژنهای مربوط به سایتو کاین ها پلی مورفیسم ۷۸۱+ در ژن IL-8 در ارتباط با بیماری AMD گزارش شده است (۱۳). در مطالعه ای که در جمعیت تایوان صورت گرفته است پلی مورفیسم ۱۰۳۱- ژن TNF-α ارتباط معنی داری با ریسک ابتلا به بیماری نشان داده است (۱۵). مطالعه ای که در ارتباط با پلی مورفیسم های 308G/A- و 1031T/C در ژن TNF-α در جمعیت شمال شرق ایران انجام شد هیچ گونه همراهی بین این پلی مورفیسم ها و بیماری AMD مشاهده نشد (۱۶).

مطالعات گذشته نشان می دهد که پلی مورفیسم های ژن CCL2 میتوانند میزان این کموکاین را تحت تاثیر قرار دهند با توجه به نتایج مطالعات راوین و همکارانش آلل C در جایگاه ۲۵۱۸- باعث افزایش سطح MCP1 ترشح شده از مونوسیت ها می شود (۹). از طرف دیگر در التهاب حادی که در AMD اتفاق می افتد میزان CCL2 در ناحیه رتینا و RPE افزایش می یابد. آکشای آناند و همکارانش ارتباط پلی مورفیسم rs4586 در این ژن را با خطر ابتلا به بیماری AMD مشاهده کردند (۱۷) در حالیکه دامینیک دسپریت و همکارانش هیچ گونه ارتباطی را در این زمینه مشاهده نکردند (۱۸).

مطالعه‌ی حاضر در جمعیت شمال غرب ایران نیز هیچ گونه ارتباط معنی داری را بین پلی مورفیسم ۲۵۱۸- ژن CCL2 و بیماری تحلیل ماکولای وابسته به سن نشان نداد. این یافته نشان دهنده ی این است که پلی مورفیسم ۲۵۱۸- در ژن CCL2 نقش مستقیمی در استعداد ابتلا به بیماری AMD ندارد که ممکن است به دلیل دخالت تغیرات ژنتیکی دیگر در این ژن و یا نقش ژن های دیگر باشد. البته با مطالعه در جمعیت های با نژاد متفاوت و یا مطالعه در سطح گسترده تر شاید بتوان نتایج متفاوتی را به دست آورد.

نتیجه نهایی:

پلی مورفیسم C-۲۵۱۸T ژن CCL2 ارتباط معنی داری با استعداد ابتلا به بیماری تحلیل ماکولای وابسته به سن ندارد. بنابراین پیشنهاد میشود بررسی های مربوط به نقش این ژن در بیماری تحلیل ماکولای وابسته به سن در سطح گسترده تری انجام شده و همین طور نقش پلی مورفیسم های دیگر و سایر ژن هایی که در ارتباط متقابل با ژن CCL2 هستند بررسی گردد.

سپاسگزاری:

این‌مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب قطب علمی تنوع زیستی دانشگاه تبریز می باشد. بدینوسیله از کلیه بیماران و خانواده های ایشان قدردانی می گردد. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع شخصی نویسندگان در تعارض نمی باشد.

References

1. Ni Dhubhghaill SS, Cahill MT, Campbell M, Cassidy L, Humphries MM, Humphries P. The pathophysiology of cigarette smoking and agerelated macular degeneration. Adv Exp Med Biol 2010; 664: 437-446.
2. Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman G. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 2006;51:137-52.
3. Klein R, Knudtson M, Klein B, Wong T, Cotch M, Liu K,etal. Inflammation, complement factor H, and age-related macular degeneration. Ophthalmology 2008; 115(10):1742–1749.
4. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. Am J Ophthalmol 2002; 134:411–31.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. Prog Retin Eye Res 2001; 20:385–414.
6. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. JAMA 1987; 257:2318–24.
7. Patel N, Adewoyin T, Chong NV. Age-related macular degeneration:a perspective on genetic studies. Eye 2008; 22(6): 768–776
8. Raman D, Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. Exp Cell Res 2011; 317(5): 575–589.
9. Rovin B, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region That influences MCP-1 expression. Biochem Biophys Res Commun 1999; 259: 344–348.
10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.Nucleic Acids Res 1988; 16(3):1215
11. Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J, et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. Exp Mol Pathol 2009; 87 234–238.
12. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. Hum Mol Genet 2006; 15(19) 2955-61.
13. Cascella R, Ragazzo M, Strafella C, Missiroli F, Borgiani P, Angelucci F,etal. Age-Related Macular Degeneration: Insights into Inflammatory Genes. J Ophthalmol 2014. doi: 10.1155/2014/582842
14. Tsai YY, Lin J, Wan L, Tsai Y, Lee CC, Tsai CH, et al. Interleukin Gene Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008; 49(2): 693-8
15. Wan L, Lin HJ, Tsai Y. Tumor necrosis factor-α gene polymorphisms in age-related macular degeneration. Retina 2010; 30:1595-600.
16. Jabbarpour Bonyadi MH. Bonyadi M, Ahmadieh H, Fotouhi N, Shoeibi N, Saadat S, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism in advanced nonexudative age related macular degeneration in northeastern Iran city of Gonabad. J Ophthalmic Vis Res. (in print)
17. Anand A, Sharma NK, Gupta A, Prabhakar S, Sharma SK, Singh R, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in MCP-1 and Its Receptor Are Associated with the Risk of Age Related Macular Degeneration. PLoS One 2012; 7(11) e49905
18. Despriet DD, Bergen AA, Merriam JE, Zernant J, Barile GR, Smith RT. Comprehensive analysis of the candidate genes CCL2, CCR2, and TLR4 in age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci Jan 2008; 49(1): 364–371.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

Study of C-2518T Polymorphism of CCL2 Gene in Age Related Macular Degeneration Patients from Northwest of Iran

T. Mohammadian, M.Sc. [*]; M. Bonyadi, Ph.D. [**]; A.R. Javadzadeh, M.D. [***]
M.H. Jabbarpoor Bonyadi, M.D. [****]

Received: 29.12.2014 Accepted: 11.5.2015

Abstract

Introduction & Objective: Age-related macular degeneration (AMD) is a disease affecting the central regions of the retina and choroid, which can lead to loss of central vision. Etiological research suggests that AMD is a complex disease, caused by the actions and interactions of multiple genes and environmental factors. Numerous studies have focused on the role of chemotactic cytokines, also known as chemokines. Certain chemokines, such as CCL2 appear to be crucial in development of retinal degeneration and choroidal neovascularization. To determine whether variants in the CCL2 gene are associated with age-related macular degeneration we studied C-2518T polymorphism of this gene in AMD patients from Northwest of Iran.

Materials & Methods: In this case-control study, the association of C-2518T polymorphism in the promoter region of CCL2 gene was investigated in 60 patients suffering from AMD and 50 healthy age, sex and ethnicity matched unrelated people as control group. Both of the case and control groups were originated from Northwest of Iran. Genotypes of both groups were determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Results: Statistical analysis shows high frequency of TT genotype and T allele in AMD patients compared to those of control group though the observed difference was not statistically significant.

Conclusion: Despite the existence of small differences between case and control groups statistical analysis of single nucleotide polymorphism (SNPs) in the CCL2 gene did not show a significant association between C-2518T polymorphism and age-related macular degeneration.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2015; 22 (2): 108-113)

Keywords: Genes, CCL2 / Macular Degeneration / Polymorphism

---

* M.Sc. in Genetics, Center of Excellence for Biodiversity, School of Natural Sciences, Tabriz University , Tabriz, Iran

** Associate Professor of Molecular Medical Genetics, Center of Excellence for Biodiversity, School of Natural Sciences Tabriz University , Tabriz, Iran (jabbarpour@tabrizu.ac.ir)

*** Professor, Department of Ophthalmology, School of Medicine Tabriz University of Medical Sciences & Health Services, Tabriz, Iran.

**** Ophthalmologist, Ophthalmic Research Center Shaheed Beheshti University of Medical Sciences & Health Services, Tehran, Iran.

www.SID.ir