Association of CCL2 C-2518T Gene Polymorphism with Age-related Macular Degeneration (AMD) Disease in Northeast of Iran

Mohammadian T, MSc*; Jabarpoor Bonyadi M, PhD; Jabarpoor Bonyadi MH, MD; Ahmadieh H, MD; Yaghoobi Z, MD

University of Tabriz, Tabriz, Iran
** Corresponding Author: t_mohamadian68@yahoo.com*

Purpose: To investigate the effect of CCL2C-2512T polymorphism on age-related macular degeneration (AMD).
Methods: This study enrolled 48 patients originating from Northeast of Iran who suffered from dry type AMD. The association of C-2518T in the promoter region of CCL2 gene was investigated using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Control group consisted of 69 healthy people and were matched for age, sex and ethnicity.
Results: Statistical analysis showed a significant association of TT genotype in this polymorphism with susceptibility to AMD (P=0.008). This genotype was more frequent in patients compared to the controls (60.41% vs 43.48%).
Conclusion: TT genotype of C-2518T gene polymorphism is associated with dry age-related macular degeneration in patients from Northeast of Iran.

Keywords: Age-related Macular Degeneration, CCL2, Polymorphism

- Bina J Ophthalmol 2015; 20 (3): 237-241. **Received:** 26 November 2014 **Accepted:** 22 January 2015

همراهی پلی‌مورفیسم C-۲۵۱۸T ژن CCL2 در مبتلایان به دژنراسیون وابسته به سن ماکولا از شمال‌شرق کشور

طاهره محمدیان[۱]*، دکتر مرتضی جبارپور بنیادی[۲]، دکتر محمدحسین جبارپور بنیادی[۳]، دکتر حمید احمدیه[۴] و دکتر زکیه یعقوبی[۵]

هدف: بررسی تاثیر پلی‌مورفیسم CCL2C-2518T در بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولا (AMD).
روش پژوهش: در این تحقیق رابطه بین پلی‌مورفیسمC-2518T در منطقه پروموتوری ژن CCL2 در ۴۸ بیمار مبتلا به AMD نوع خشک از منطقه شمال‌شرق کشور (شهرستان گناباد) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تکنیک پلی‌مورفیسم، طول قطعات هضم شده (RFLP) بررسی شد. گروه شاهد از ۶۹ فرد سالم که از نظر سن، جنس و قومیت با گروه بیمار مطابقت داشته و فاقد رابطه خانوادگی با آن‌ها و یا سابقه بیماری AMD در فامیل بودند، تشکیل شد.
یافته‌ها: افزایش فراوانی ژنوتیپی TT در این پلی‌مورفیسم به صورت معنی‌دار (P=۰/۰۰۸) در میان بیماران مبتلا به AMD بیان‌کننده ارتباط احتمالی این ژنوتیپ با استعداد ابتلا به بیماری AMD در این جمعیت می‌باشد. این ژنوتیپ در گروه بیماران نسبت به گروه شاهد دارای فراوانی بیش‌تری است (۶۰/۴۱ درصد در برابر ۴۳/۴۸ درصد).
نتیجه‌گیری: ژنوتیپ TT پلی‌مورفیسم C-2518T با بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولا در مبتلایان از شمال‌شرق ایران مرتبط می‌باشد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۳؛ دوره ۲۰، شماره ۳: ۲۴۱-۲۳۷.

• **پاسخ‌گو:** طاهره محمدیان (e-mail: t_mohamadian68@yahoo.com)
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد- قطب علمی تنوع زیستی- دانشکده علوم طبیعی- دانشگاه تبریز- تبریز- ایران
۲- دانشیار- دکترای ژنتیک پزشکی- دانشکده علوم طبیعی- دانشگاه علوم پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات سلامت کودکان- دانشگاه علوم پزشکی تبریز- تبریز- ایران

دریافت مقاله: ۵ آذر ۱۳۹۳
تایید مقاله: ۳ بهمن ۱۳۹۳

Archive of SID
www.SID.ir

۳- چشم‌پزشک- قطب علمی تنوع زیستی- دانشگاه علوم پزشکی گناباد- گناباد- ایران
۴- استاد- چشم‌پزشک- دانشگاه شهید بهشتی- تهران- ایران
۵- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی گناباد- گناباد- ایران
تبریز- بلوار ۲۹ بهمن- خیابان امام خمینی- دانشگاه تبریز

مقدمه

تحلیل وابسته به سن ماکولا یا Age Related Macular Degeneration (AMD) بیماری چشمی سالمندان است. علت این بیماری، آسیب گیرنده‌های نوری و اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای شبکیه (RPE) در ماکولا می‌باشد[۱-۲]. تحلیل ماکولای وابسته به سن به دو شکل آتروفیک (خشک) و اگزوداتیو (مرطوب) رخ می‌دهد. نوع خشک، آتروفی اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای شبکیه و دژنراسیون گیرنده‌های نوری است که علت ۲۵ درصد از موارد از دست رفتن بینایی مرکزی می‌باشد و با تشکیل دروزن در محل لکه زرد شناخته می‌شود. نوع مرطوب با نورگ‌زایی کورویيدی (CNV) و به دنبال آن خون‌ریزی، تقریباً ۷۵ درصد از موارد زوال بینایی را شامل می‌شود[۳].

این بیماری یک سندرم چندعلتی است که عوامل رفتاری، تغذیه‌ای و محیطی در آن دخیل می‌باشند[۴و۵]. میزان بروز این بیماری در سنین ۶۵ تا ۷۴ سال حدود ۱۱ درصد و در سنین بالاتر از ۷۵ سال حدود ۲۸ تا ۳۰ درصد می‌باشد[۶]. علاوه بر عوامل خارجی، زمینه ژنتیکی هم در ایجاد بیماری موثر است[۷]. شواهد بسیاری نشان می‌دهند که مسیرهای مربوط به پاسخ های ایمنی و التهابی در بیماری AMD مختل می‌شوند[۸].

مطالعات ژنتیکی ارتباط بین ژن‌های مربوط به سیستم کمپلمان از جمله CFH، FB و C2 را نشان داده‌اند. اختلال در عملکرد این ژن‌ها منجر به افزایش فعالیت سیستم کمپلمان و افزایش آزاد شدن پروتیین‌های پیش‌التهابی در پاسخ‌های التهابی می‌گردد[۹و۱۰].

کموکاین‌ها از نظر ساختاری مربوط به سایتوکاین‌های کموتاکتیک بوده و نقش مهمی در فرایند التهاب و مهاجرت لکوسیت‌ها دارند[۱۱]. CCL2 (Chemo-Attractant Protein-1) به عنوان عضوی از خانواده‌ی کموکاین‌ها و گیرنده آن CCR2 (C-C chemokine receptor-2) واسطه‌های مهمی در فیلتراسیون مونوسیت‌ها از خون به محل التهاب هستند. CCL2 اثر خود را پس از اتصال به CCR2 اعمال می‌کند که منجر به نوآرایی آکتین، تغییرشکل و حرکت مونوسیت‌ها می‌شود[۱۱]. شواهد مربوط به نقش احتمالی CCL2 و CCR2 در بیماری AMD توسط Ambati و همکاران ارایه شد که نشان دادند در موش‌های پیر با نقص در این ژن‌ها علایمی از بیماری AMD از جمله تجمع دروزن در ماکولا مشخص می‌شود. بیان CCL2 در شبکیه و RPE در حیوانات جوان سالم پایین است در حالی که در التهاب حاد با افزایش سن، استرس اکسیداتیو در اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای شبکیه افزایش پیدا می‌کند[۱۲و۱۳].

با توجه به نقش التهاب و ژن‌های التهابی در بیماری AMD، هدف این مطالعه بررسی تاثیر پلی‌مورفیسم پروموتریC-2518T ژن CCL2 بر استعداد ابتلا به بیماری AMD در مبتلایان به این بیماری در شمال‌شرق ایران، شهر گناباد که دارای جمعیتی با طول عمر بالا است، می‌باشد.

روش پژوهش

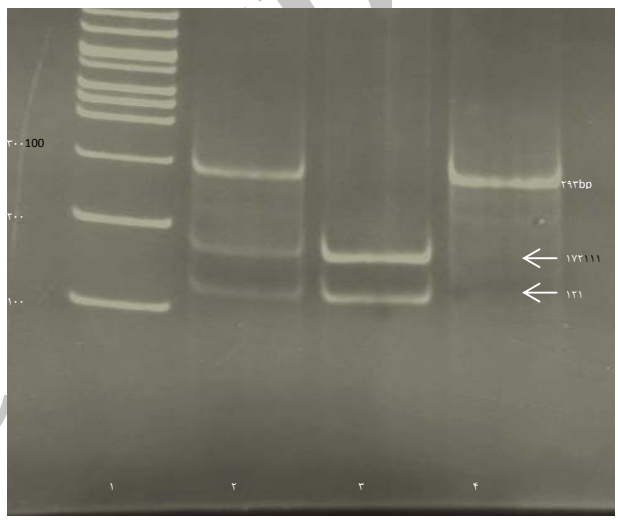
در این مطالعه مورد- شاهد، ۴۸ فرد غیرخویشاوند از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان ۲۲ بهمن شهر گناباد مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی بیماران مسن‌تر از ۶۰ سال بوده و حداقل در یک چشم خود مبتلا به AMD نوع خشک با آتروفی جغرافیایی بودند. افراد تحت معاینه کامل چشم‌پزشکی شامل بررسی حدت بینایی, فوندوسکوپی, فوندوس فوتوگرافی و فلوروسین آنژیوگرافی قرار گرفتند. تصویربرداری بیماران در بیمارستان‌های خاتم‌الانبیا و توس مشهد صورت گرفت. پس از تایید ابتلای این بیماران به AMD توسط متخصصین مربوطه براساس شاخص‌های تشخیصی ارایه شده توسط Bird و همکاران[۱۴]، مشاوره ژنتیکی و ترسیم شجره‌نامه خانوادگی انجام شد. از میان همراهان بیماران مراجعه کننده به دیگر درمانگاه‌های بیمارستان، افراد بالای ۶۰ سال به صورت تصادفی به عنوان گروه شاهد مورد معاینه چشم قرار گرفتند که در صورت عدم مشاهده آثار دژنراسیون وابسته به سن ماکولا یا بیماری دیگر شبکیه به عنوان گروه شاهد برای ورود به مطالعه انتخاب شدند. بیماران و گروه شاهد با هم‌دیگر رابطه خویشاوندی نداشته و فاقد بیماری‌های کلیه, قلب و عروق، دیابت و یا سایر بیماری‌های شبکیه یا یووییت بودند.

پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از بیماران، نمونه‌گیری از خون وریدی انجام شد و DNA ژنومی از خون افراد با استفاده از پروتکل نمک اشباع استخراج گردید. DNA استخراج شده با استفاده از

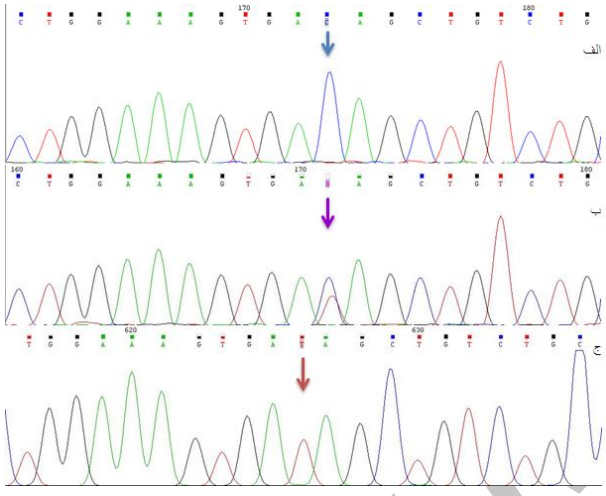
www.SID.ir
Archive of SID

روش PCR و پرایمرهای مناسب تکثیر و پس از آن ژنوتیپ افراد در جایگاه پلی‌مورفیسم مربوطه توسط روش PCR-RFLP و به کارگیری آنزیم محدودالاثر PVUII، تعیین گردید. محصولات هضم آنزیمی PCR که به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده بودند، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز 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 می‌دهد و دو قطعه ۱۲۱بازی و ۱۷۲بازی را تولید می‌کند، بنابراین در نمونه-های با ژنوتیپ CC دو باند و در ژنوتیپ TC سه باند ۲۹۳، ۱۲۱ و ۱۷۲بازی مشاهده گردید (تصویر ۱). برای اطمینان از صحت ژنوتیپ‌های تعیین شده تعدادی از نمونه‌ها به روش Sequencing توالی‌یابی شدند که نتایج حاصل از PCR-RFLP را تایید کرد (تصویر ۲).

تفاوت‌های ژنوتیپی و آللی موجود در میان گروه بیمار و شاهد با استفاده از آزمون دقیق فیشر و کای‌مربع مورد بررسی قرار گرفت. P کم‌تر از ۰/۰۵ از نظر آماری به صورت معنی‌دار در نظر گرفته شد.



تصویر ۱- محصولات RFLP-PCR پلی‌مورفیسم C-۲۵۱۸ T ژن CCL2.
۱:مارکر ۲: ژنوتیپ CT ۳: ژنوتیپ CC ۴:ژنوتیپ TT



تصویر ۲- نتایج حاصل از توالی یابی ژن CCL2 در جایگاه ۲۵۱۸- : الف) ژنوتیپ CC ب) ژنوتیپ TC ج) ژنوتیپ TT

یافته‌ها

برای بررسی پلی‌مورفیسمC-2518T در ژن AMD، ۴۸ فرد مبتلا به بیماری AMD و ۶۹ فرد سالم به عنوان شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. میانگین سنی افراد مبتلا ۷۵/۸ سال بود. اطلاعات بیماران در جدول ۱ ارایه شده است. توزیع ژنوتیپی بین گروه شاهد و بیمار بررسی شد. فراوانی ژنوتیپی به ترتیب برای ژنوتیپ های TT,TC,CC در گروه بیماران ۸/۳۳، ۳۱/۲۵، ۶۰/۴۱ درصد و در گروه شاهد ۵/۸۰، ۵۰/۷۲، ۴۳/۴۸ درصد مشاهده گردید. هم‌چنین فراوانی آللی برای هر دو گروه محاسبه گردیدکه این مقدار برای آلل‌های T و C در گروه بیماران۷۶/۰۴ و ۲۳/۹۵ و در گروه شاهد ۶۸/۸۴ و ۳۱/۱۵ بود. مقدار P محاسبه شده برای این گروه‌ها تنها در مورد ژنوتیپ‌های TT و TC به صورت معنی‌دار بود (۰/۰۰۳و P=۰/۰۰۸). نتایج حاصل از بررسی‌های آماری در جدول ۲ ارایه شده است.

بحث

نتایج حاصل از آزمایشات ما نشان دهنده‌ی ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ TT این پلی‌مورفیسم و بیماری AMD در منطقه شمال شرق ایران (شهر گناباد) می‌باشد زیرا فراوانی این ژنوتیپ به صورت معنی‌داری در افراد مبتلا در این منطقه‌ی جغرافیایی بالا است.

تحلیل وابسته به سن ماکولا، امروزه یکی از مهم‌ترین علل نابینایی در جهان محسوب می‌شود که علت آن نامشخص است. نقش ژنتیک در بیماری AMD با انجام مطالعات خانوادگی و مطالعه بر روی دوقلوها مشخص شده است. بررسی یک‌سری مطالعات که نشان‌دهنده همراهی بیماری AMD و عوامل ژنتیک است نشانگر این است که در این بیماری همانند سایر بیماری‌های پیچیده و هتروژن، چندین ژن می‌توانند در بروز و پیش‌رفت بیماری موثر باشند[۱۴].

www.SID.ir

جدول ۱- اطلاعات بیماران شرکت‌کننده در مطالعه

	آتروفی جغرافیایی (۴۸ نفر)	شاهد (۶۹ نفر)	میزان P
جنس (مرد / زن)	۲۴/۲۴	۳۴/۳۵	>۰/۹۹
مصرف سیگار (سیگاری/ غیرسیگاری)	۴۳/۵	۶۲/۷	۰/۷۰
سن (انحراف معیار±میانگین)	۷۵/۸۸±۷/۲۰	۷۲/۴۲±۷/۴۵	۰/۰۱
توزیع سنی ۶۹-۶۰	۱۱	۲۴	>۰/۰۵
۷۹-۷۰	۲۱	۳۴	
بالای ۸۰	۱۶	۱۱	

جدول ۲- توزیع ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم C-۲۵۱۸T در دو گروه شاهد و بیمار

ژنوتیپ‌ها	بیمار (۴۸ نفر) تعداد (درصد)	شاهد (۶۹ نفر) تعداد (درصد)	Odds ratio	میزان P
TT	۲۹ (۶۰/۴۱)	۳۰ (۴۳/۴۸)	۱/۹۸۴	۰/۰۰۸
TC	۱۵ (۳۱/۲۵)	۳۵ (۵۰/۷۲)	۰/۴۴۲	۰/۰۰۳
CC	۴ (۸/۳۳)	۴ (۵/۸۰)	۱/۴۷۹	۰/۲۱۴
آلل‌ها				
T	۷۳ (۷۶/۰۴)	۹۵ (۶۸/۸۴)	۱/۴۳۷	۰/۱۰۶
C	۲۳ (۲۳/۹۵)	۴۳ (۳۱/۱۵)	۰/۶۹۶	۰/۱۰۰

از جمله مهم‌ترین ژن‌هایی که نقش آن‌ها در این بیماری مطالعه شده، ژن‌های خانواده‌ی کمپلمان می‌باشند. برای نمونه، پلی‌مورفیسم Y402H ژن CFH (کمپلمان فاکتورH) با بیماری AMD در چندین مطالعه مشاهده شده است. از جمله ژن‌های دیگر که ارتباط آن با این بیماری گزارش شده ژن HTRA1 (پروتیین نیاز دمایی بالای A1) از خانواده‌یARMS2 (ژن ایجاد حساسیت ماکولوپاتی وابسته به سن۲) می‌باشد[۱۵و۱۶].

مطالعات اخیر، التهاب را به عنوان بخش مهمی از بیماری AMD معرفی می‌کند. بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن‌های درگیر در AMD و سطح بیان این ژن‌ها پیشنهاد می‌کند که تغییرات ژنتیکی در ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین‌های التهابی مثل سایتوکاین‌ها می‌تواند در استعداد ابتلا به بیماری AMD موثر باشد. تعداد زیادی از مطالعات، ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های خانواده کموکاین را در مبتلایان به این بیماری بررسی کرده‌اند[۱۷].

بررسی‌های Hyun Lee Kim و همکاران[۱۸] نشان داده که پلی‌مورفیسم C-2518T در ژن CCL2 با میزان گردش کموکاین MCP1 در ارتباط است و آلل T این پلی‌مورفیسم سطح بیان MCP1 را در برخی بیماری‌ها مانند لوپوس سیستمیک اریتروماتوزیس افزایش می‌دهد.

نتایج کار Akshay Anand و همکاران[۱۹] نشان داد که مقدارCCL2 در افراد مبتلا به AMD بالا است. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که پلی‌مورفیسم rs4586 این ژن با بیماری AMD در جمعیت هند در ارتباط می‌باشد. با این حال نتایج کار William Raoul و همکاران هیچ ارتباطی را بین ژن CCL2 و بیماری AMD مشخص نکردند[۱۰]. Despriet و همکاران[۲۰] نیز در بررسی که بر روی ارتباط ژن های CCL2، CCR2 وTLR4 انجام دادند ارتباط معنی‌داری بین تنوعات ژنتیکی موجود در این ژن‌ها و استعداد ابتلا به بیماری AMD در جمعیت هلند مشاهده نکردند.

شهر گناباد یکی از شهرهای قدیمی در شمال‌شرق ایران است که جمعیت این شهر طول عمر بالایی دارند (به استناد سرشماری سال ۱۳۸۵). طبق این سرشماری تقریبا ۱۰ درصد جمعیت این ناحیه مسن‌تر از ۶۰ سال هستند[۲۱]، گرچه فقط ۴۸ بیمار در این مطالعه وارد شدند ولی ما تقریبا ۳۰ درصد از جمعیت بالای ۶۰ سال این ناحیه را مورد بررسی قرار دادیم و تمام افراد مبتلا از

www.SID.ir
Archive of SID

آن‌ها وارد مطالعه شدند[۲۱].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین می‌توان این احتمال را داد که ژنوتیپ TT در پلی‌مورفیسم C-2518T با تاثیر بر سطح بیان ژن CCL2 در بروز حساسیت به بیماری AMD نقش داشته باشد. تفاوت در زمینه ژنتیکی افراد که مربوط به نژادهای متفاوت می‌باشند و هم‌چنین نقش مبهم سایر تنوعات ژنتیکی در حساسیت افراد به این بیماری، می‌تواند دلیل مغایرت نتایج حاصل‌شده از مطالعه ما با یافته‌های بررسی‌های پیشین باشد.

منابع

1. Klein R, Peto T, Bird A, et al. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004;137:486-495.
2. Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol* 1976;60:324-341.
3. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, et al. The Framingham Eye Study Monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration and visual acuity in a general population of 2631 adults. *Surv Ophthalmol* 1973-1975;24:335-610.
4. Seddon JM, Willett WC, Speizer FE, et al. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. J Am Med Assoc 1996; 276:1141-1146.
5. Snodderly DM. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr Suppl* 1995;62:1148s-1161s.
6. Klein R, Klein BEF, Linton KLP. Prevalence on age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992;99:933-943.
7. Heiba IM, Eiston RC, Klein BE, et al. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Gen Epidemiol* 1994;11:51-67.
8. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, et al. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. Prog Retin Eye Res. 2001;20:705-732.
9. Nagahisa Y. Age-related macular degeneration and genetics, Clinical and Experimental Ophthalmology 2010; 38: 1 1442-9071
10. William R, Constance A, Serge C, et al. CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes and their possible involvement in age-related macular degeneration. *J Neuro inflam* 2010;7:87.
11. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-445.
12. Yamada K, Sakurai E, Itaya M, et al. Inhibition of laser induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemotactic protein-1 synthesis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1839-1843.
13. Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2425-2430.
14. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 1995;39:367-374.
15. Swaroop A, Chew EY, Rickman CB, et al. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009;10:19-43.
16. Patel N, Adewoyin T, Chong NV. Age-related macular degeneration: a perspective on genetic studies. *Eye* 2008;22:768-776.
17. Farwick A, Dasch B, Weber B, et al. Variations in five genes and the severity of agerelated macular degeneration: results from the Muenster aging and retina study. *Eye* 2009;23:2238-2244.
18. Hyun Lee Kim, Dong-Sup Lee, Seung Hee Yang, et al. The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of sle. *Am J Kidney Diseases* 2002;40;1146-1152.
19. Akshay A, Neel K, Amod G, et al. Single nucleotide polymorphisms in MCP-1 and its receptor are associated with the risk of age related macular degeneration. *Plos O*ne 2012;1-10.
20. Despriet DD, Bergen AA, Merriam JE, et al. Comprehensive analysis of the candidate genes CCL2, CCR2, and TLR4 in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:364-371.
21. Jabbarpour Bonyadi MH. TNF gene polymorphism in advanced non exudative AMD in north eastern Iran. JOVR(under press)

Archive of SID

www.SID.ir