پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۲۹ تا ۳۴

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی نقش جهش‌های شایع ژن NOD2 در بیماری کرون

نصرت اله نادری[۱]، ناصر ابراهیمی دریانی[۲]، آلما فرنود[۲*]، منیژه حبیبی[۱]، هدیه بالایی[۱]، افسانه شریفیان[۱]، همایون زجاجی[۱]، محمد رضا زالی[۱]

[۱] مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] گروه بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *ژن NOD2 واقع در ناحیه کروموزومی 16q12 (IBD1) به عنوان ژنی که با بیماری کرون همراهی دارد، شناخته شده است. در جمعیت‌های غربی سه پلی‌مورفیسم G908R، R702W و 1007fsinsC این ژن در بیماران کرون با فراوانی بیشتری گزارش شده‌اند، در حالی که در کشورهای آسیای دور این همراهی مشاهده نشده است. در مطالعه حاضر، فراوانی سه پلی‌مورفیسم شناخته شده ژن NOD2 در بیماران ایرانی مبتلا به کرون در مقایسه با افراد شاهد تعیین گردید.*

روش بررسی *در مطالعه‌ای مورد-شاهدی، ۱۰۰ بیمار کرون و ۱۰۰ فرد سالم که از نظر سن و جنس با بیماران همسان بودند، طی دو سال (۱۳۹۰-۱۳۸۹) در بیمارستان امام خمینی (وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران) مورد معاینه و نمونه‌گیری قرار گرفتند. بررسی سه جهش شناخته شده ژن NOD2 بر روی نمونه‌های DNA بیماران کرون و افراد سالم به روش PCR (polymerase chain reaction) و Direct Sequencing انجام گرفت. همراهی ژنوتیپ و فنوتیپ این پلی مورفیسمها نیز تعیین شدند.*

یافته‌ها: *فراوانی سه پلی‌مورفیسم R702W، G908R و 1007fsinsC در بیماران مبتلا به کرون به ترتیب ۱۳٪، ۲/۵٪ و ۲٪ و در افراد شاهد سالم به ترتیب ۱/۵٪، ۱/۵٪ و ۱٪ به دست آمد. در بین این سه جهش فقط فراوانی R702W در بیماران مبتلا به کرون به شکل معنی‌داری بیش از گروه شاهد بود (p<۰/۰۰۱)، ولی ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ بیماران و فنوتیپ آنها یافت نشد.*

نتیجه‌گیری: *تنها یکی از سه جهش شایع ژن NOD2 (R702W) در بیماران ایرانی مبتلا به کرون با بیماری همراه بود. فراوانی این جهش‌ها نسبت به سایر جوامع متفاوت است. با توجه به اهمیت این ژن شاید سایر نواحی آن در حساسیت به بیماری کرون در جمعیت ایرانی موثر باشد.*

واژگان کلیدی: *بیماری کرون، ژن NOD2، پلی‌مورفیسم.*

مقدمه

بیماری کرون، نوعی از بیماری‌های التهابی روده است که با التهاب مزمن و گرانولوماتوی دستگاه گوارش شناخته می‌شود. التهاب در این بیماری ممکن است هر قسمتی از سیستم گوارش را درگیر کند و التهاب ایجاد شده معمولاً تمام ضخامت لوله گوارشی را در بر می‌گیرد (۱). بیماری کرون مشکل ناتوان کننده‌ای است و بیشتر بالغین جوان را مبتلا می‌نماید و با وجود این که مرگ در اثر این بیماری، امروزه خیلی شایع نیست، اختلالات ایجاد شده می‌تواند اثری بسیار مخرب بر سلامت، تحصیل، کار و سیر زندگی فرد مبتلا داشته باشد. تاکنون شیوع دقیق بیماری کرون در کشور ما مورد بررسی قرار نگرفته است، ولی براساس مطالعات محدود انجام شده، شیوع این بیماری در ایران رو به افزایش است (۲).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انتهای بلوار کشاورز، بیمارستان امام خمینی، دکتر **آلما فرنود**
(**e-mail:** a_farnood@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۳/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۱۸

Archive of SID
www.SID.ir

علت دقیق بیماری کرون هنوز ناشناخته است. به نظر می‌رسد که این بیماری ناشی از واکنش التهابی افزایش یافته در پاسخ به باکتری‌ها و آنتی‌ژن‌های روده‌ای باشد (۳). نقش فاکتورهای ژنتیکی در بیماری کرون ابتدا با مطالعات اپیدمیولوژیک مطرح شد و سپس با بررسی‌های فامیلی و مطالعات دوقلوهای تک‌تخمی تایید شد (۴). در مطالعات بعدی مناطق متعددی از ژنوم با بیماری کرون مرتبط شناخته شد (۶، ۵). یکی از این مناطق مرتبط که همبستگی زیادی با بیماری کرون نشان داد، ناحیه‌ای بر روی کروموزوم ۱۶q۱۲ به نام IBD1 بود (۵). این ناحیه شامل ژن‌های متعددی از جمله اولین ژن مرتبط با کرون، به نام (Nucleotide Oligomerization Domain2) NOD2 می‌باشد (۱۰-۷). ژن NOD2 که بعدها CARD15 (Caspase Recruitment Domain 15) نام گرفت، پروتئین NOD2 را کد می‌کند. از نظر ساختمانی این پروتئین دارای دو قطعه CARD (Caspase Recruitment Domain)، یک قطعه NOD (Nucleotide Oligomerization Domain) و یک قسمت غنی از لوسین به نام (Leucine Rich Repeat) LRR می‌باشد (۱۱، ۱۲).

بسیاری از مطالعات جهت تعیین نقش ژن NOD2 در بیماری کرون انجام گرفته است و همراهی واریاسیون‌های این ژن با کرون در جمعیت‌های متعدد سفیدپوست گزارش شده است. سه جهش تک نوکلوتیدی این ژن شامل R702W (SNP8)، G908R (SNP12) و1007fsinsC (SNP13) در جمعیت‌های مختلف امریکایی و اروپایی با بیماری کرون مرتبط شناخته شده‌اند (۱۸-۱۳)، در حالی که فراوانی این جهش‌ها در کشورهای چین، ژاپن و کره بسیار کم گزارش شده است و هیچ یک با بیماری کرون مرتبط نبوده‌اند (۲۲-۱۹). در مطالعه‌ای در ایران، فقط یکی از سه موتاسیون معروف ژن NOD2 (R702W) با بیماری کرون مرتبط شناخته شده و فراوانی دو واریاسیون دیگر کمتر از ۵٪ گزارش شده است (۲۳).

با توجه به اهمیت ژن NOD2 در پاتوژنز بیماری کرون و بررسی‌های محدود بر روی فراوانی جهش های این ژن در جمعیت ایرانی، هدف ما در مطالعه حاضر مشخص نمودن فراوانی سه جهش شایع ژن NOD2/CARD15 شامل G908R، R702W و 1007fsinsC در بیماران ایرانی مبتلا به بیماری کرون در سالهای ۹۰-۱۳۸۹ در بیمارستان امام خمینی و مقایسه آنها با گروه شاهد سالم بود.

مواد و روشها

این مطالعه به روش مورد-شاهد طراحی و اجرا گردید. در این بررسی ۱۰۰ بیمار کرون تک گیر و ۱۰۰ شاهد سالم که از نظر سن، جنس و وضعیت اقتصادی و اجتماعی با بیماران همسان بودند، وارد مطالعه گردیدند. این افراد در مدت دو سال (۱۳۹۰-۱۳۸۹) به بیمارستان امام خمینی (دانشگاه علوم پزشکی تهران) مراجعه نموده بودند. بیماری کرون براساس یافته‌های بالینی، آندوسکوپی، رادیولوژیک و هیستوپاتولوژیک (۲۵، ۲۴، ۱) توسط متخصص گوارش تشخیص داده شد و پرسش‌نامه کاملی برای هر بیمار تکمیل گردید. فنوتیپ کرون براساس طبقه‌بندی وین (۲۶) شامل منطقه بیماری، رفتار بیماری و سن در زمان تشخیص، گروه‌بندی شد. گروه شاهد از افراد سالم بدون علایم گوارشی یا سابقه شخصی یا خانوادگی هر بیماری مهمی انتخاب شدند. پروتکل مطالعه توسط گروه اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد مورد تأیید قرار گرفته و از هر بیمار فرم رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید.

DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون محیطی به روش استاندارد " فنل کلروفورم" (۲۷) استخراج شد. مناطقی از ژن NOD2 که دارای جهش های مورد نظر بودند، با پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) طی واکنش(Polymerase Chain Reaction) PCR تکثیر شدند.

واکنش PCR در حجم ۲۵ µl حاوی ۱۰ mM از محلول Tris-HCL با PH برابر ۸/۸، ۱/۵ mM از محلول MgCl2 ، ۵۰ mM از محلول KCL، ۲۵۰ mM از محلول dNTPs، ۰/۵ mM از هر یک از پرایمرها، ۲ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز (ساخت شرکت فرمنتاز، آلمان) و ۲۰۰ ng از DNA ژنومی انجام گرفت. شرایط PCR برای تمام قطعات عبارت بود از: دناتوراسیون ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. سنتز مناسب محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز (۱/۵٪) بررسی گردید و سپس قطعات تکثیر شده، سکانس گردیدند (با دستگاه ABI 3130XL Genetic Analyzer ساخت شرکت Applied Biosystems، امریکا) تا از نظر جهش‌های مورد نظر بررسی شوند. محاسبات آماری با استفاده از آزمون کای‌دو و آزمون دقیق فیشر انجام گرفت و P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 13، امریکا) آنالیز گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در تکثیر قطعات هر یک از جهش‌های ژن NOD2

جهش	پرایمرها	اندازه
R702W	FWD TGCTGCTACGTGTTCTC	۴۵۶
	REVCAGACACCAGCGGGCACAG	
G908R	FWDAAGTCTGTAATGTAAAGCCAC	۳۸۰
	REV CCCAGCTCCTCCCTCTTC	
1007fsinsC	FWDCTCACCATTGTATCTTCTTTTC	۲۲۸
	REV ATGTCAGAATCAGAAGGG	

یافته‌ها

میانگین سنی افراد گروه شاهد (n=۱۰۰) ۹/۷±۳۵ و بیماران مبتلا به کرون (n=۱۰۰) ۱۰/۵±۳۴/۵ سال بود. نسبت مرد به زن در هر دو گروه مطالعه برابر با ۱/۵ به ۱ بود. خصوصیات بالینی بیماران براساس طبقه‌بندی وین (Vienna Classification) در جدول ۲ خلاصه شده است. شایع‌ترین محل درگیری در این گروه از بیماران کرون ایلئوکولیک (۳۸٪) و کمترین محل درگیری دستگاه گوارش فوقانی (۴٪) بود. شایع‌ترین رفتار بیماری هم درگیری التهابی (۵۶٪) بود.

جدول ۲- خصوصیات بالینی بیماران ایرانی مبتلا به کرون

طبقه بندی بیماران کرون (n=۱۰۰)	درصد
محل بیماری	
درگیری ایلئوم (L1)	۲۸
درگیری کولون (L2)	۳۰
درگیری ایلئوکولیک (L3)	۳۸
درگیری دستگاه گوارش فوقانی (L4)	۴
رفتار بیماری	
بیماری التهابی	۵۶
بیماری Stricturing	۲۰
بیماری Penetrating	۲۴
سن در زمان تشخیص (زیر ۴۰ سال)	۴۲

* : بر اساس تقسیم بندی وین (۲۶)

فراوانی سه پلی‌مورفیسم R702W (SNP8)، G908R (SNP12) و1007fsinsC (SNP13) ژن NOD2 در بیماران مبتلا به کرون به ترتیب ۱۳٪، ۲/۵٪ و ۲٪ و در افراد شاهد سالم به ترتیب ۱/۵٪، ۱/۵٪ و ۱٪ به دست آمد (جدول ۳). در بین سه جهش بررسی شده جهش R702W (SNP8) در بیماران کرون فراوانی ای بیش از ۵٪ داشت و در بیماران کرون نسبت به گروه شاهد فراوانی بیشتری داشت که این اختلاف از نظر آماری هم معنی‌دار شد (۱۳٪ در بیماران مبتلا به کرون در برابر ۱/۵٪ در افراد شاهد سالم، p<۰/۰۰۱، OR =۹/۸۱، ۹۵٪CI= ۲/۹۲-۳۳).

در این بررسی فراوانی آلل‌های جهش یافته R702W ژن NOD2 (جدول ۴) با هیچ یک از فنوتیپ‌های بیماری کرون همراهی نداشت. در مجموع در سایر جهش‌ها نیز ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ بیماران و فنوتیپ آنها یافت نشد.

بحث

بر اساس یافته‌های این مطالعه، فقط فراوانی جهش R702W در بیماران کرون به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد به دست آمد (p<۰/۰۰۱). در مطالعه‌ای بر روی ۴۰ بیمار مبتلا به کرون در ایران که فراوانی سه جهش شایع ژن NOD2 را بررسی نموده بود هم فقط فراوانی موتاسیون R702W در بیماران کرون نسبت به گروه شاهد بیشتر گزارش شده بود (۱۶/۳٪ در برابر ۱٪، OR=۱۹/۲ -۸۷/۳ CI = ۴/۲ ۹۵٪) (۲۳). البته OR (نسبت شانس) محاسبه شده در مطالعه حاضر (۹/۸۱) نسبت به مطالعهٔ مذکور (۱۹/۲) پایین‌تر است و با توجه به تعداد بیشتر بیماران مورد بررسی نسبت به مطالعه قبلی (۱۰۰ بیمار کرون در برابر ۴۰ بیمار) هم طیف OR محدودتر شده است و هم OR به دست آمده به دلیل تعداد نمونه بیشتر و روش دقیق‌تر [Sequencing در برابر (RFLP) Restriction Fragment Length Polymorphism] نتایج قابل اعتمادتری را به دست می‌دهد. جهش R702W باعث جابجایی نوکلئوتیدی در موقعیت ۲۱۰۴ ژن NOD2 می‌شود. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که این تغییر موجب کاهش فعالیت NF-KB در پاسخ به اجزای میکروارگانیسم‌ها می‌گردد و احتمال دارد موجب افزایش استعداد ابتلا به بیماری کرون گردد (۲۸).

مطالعات مشابه در جمعیت‌های اروپایی نیز همراهی جهش R702W با بیماری کرون را نشان داده‌اند که نسبت شانس (OR) مربوط به آن در لهستان ۵/۹ (۳۰، ۲۹) و در یونان ۱۱/۱ (۳۲، ۳۱) گزارش گردیده‌اند. این OR ها به نسبت شانس به دست آمده در مطالعهٔ حاضر (۹/۸۱) بسیار نزدیک است. سایر بررسی‌ها در جمعیت‌های دیگر اروپایی از جمله ایتالیا نیز همراهی مشابهی را گزارش نموده‌اند. به طور کلی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های سه جهش شایع ژن NOD2 در بیماران مبتلا به کرون و افراد شاهد سالم

	آلل ها (درصد)			ژنوتیپ‌ها (درصد)		
R702W	T	C	T/T	C/T	C/C
کرون (n=۱۰۰)	۲۶ (۱۳)	۱۷۴ (۸۷)	۲ (۲)	۲۲ (۲۲)	۶۶(۶۶)
شاهد سالم (n=۱۰۰)	۳ (۱/۵)	۱۹۷ (۹۸/۵)	۰	۳ (۳)	۹۷ (۹۷)
G908R	C	G	C/C	G/C	G/G
کرون (n=۱۰۰)	۵ (۲/۵)	۱۹۵ (۹۷/۵)	۰	۵ (۵)	۹۵ (۹۵)
شاهد سالم (n=۱۰۰)	۳ (۱/۵)	۱۹۷ (۹۸/۵)	۰	۳ (۳)	۹۷ (۹۷)
1007fsinsC	+	-	+/+	- /+	- / -
کرون (n=۱۰۰)	۴ (۲)	۱۹۶ (۹۸)	۰	۴ (۲)	۹۶ (۹۶)
شاهد سالم (n=۱۰۰)	۲ (۱)	۱۹۸ (۹۹)	۰	۲ (۲/۲)	۹۸ (۹۸)

جدول ۴- آلل‌های سه جهش شایع ژن NOD2 در بیماران مبتلا به کرون و افراد شاهد سالم

ناحیه تغییرات در ژن و نوکلئوتید	ناحیه تغییرات در پپتید	مارکر پلی مورفیک	تعداد آلل‌ها (درصد)		P value
			کرون (n=۲۰۰)	شاهد (n=۲۰۰)	
۲۱۰۴ C → T	R 702 W	SNP 8	۲۶ (۱۳)	۳ (۱/۵)	<۰/۰۰۱*
۲۷۲۲ G → C	G 908 R	SNP 12	۵ (۱/۵)	۳ (۱/۵)	NS†
۳۰۲۰ insC	1007fsinsC	SNP 13	۴ (۲)	۲ (۱)	NS

* نسبت شانس (فاصله اطمینان ۹۵ درصد)= (۳۳- ۲/۹۲) ۹/۸۱ ؛ † Not significant

فراوانی جهش R702W در ایران هم در بیماران کرون و هم در گروه شاهد مشابه جمعیت اروپایی می‌باشد (۳۵-۳۰).

فراونی آلل دو جهش G908R و 1007fsinsC در بیماران مبتلا به کرون و در افراد شاهد جمعیت ایرانی کم به دست آمده است. فراوانی پایین این جهش‌ها در مطالعه قبلی در ایران نیز گزارش شده بود (۲۳) و نتایج مطالعه حاضر تایید کننده یافته های قبلی اند. در مطالعه حاضر جهش 1007fsinsC فراوانی بسیار کمی در بیماران کرون و نیز افراد شاهد سالم داشت و ارتباطی بین آلل جهش یافته این موتاسیون و بیماری کرون یافت نشد. بر خلاف این یافته‌ها در جوامع غربی جهش 1007fsinsC به عنوان یکی از مهم‌ترین موتاسیونهای ژن NOD2 در بیماران مبتلا به کرون مطرح است. این جهش در اثر ورود یک نوکلئوتید در زنجیره DNA و ایجاد موتاسیون Frame Shift به وجود می آید. فراوانی آلل جهش یافته 1007fsinsC در اروپا و امریکا در بیماران مبتلا به کرون به شکل معنی‌داری بیش از افراد شاهد گزارش شده است (۳۵-۳۰)، در حالی که فراوانی این جهش در جمعیت‌های آسیای دور مانند ژاپن، چین و کره بسیار کم یافت شده است (۲۲-۱۹). به نظر می‌رسد که بر خلاف جهش R702W فراوانی موتاسیون 1007fsinsC در جمعیت ایرانی به مطالعات آسیای دور شبیه تر از جوامع اروپایی است.

در مورد جهش G908R تاکنون نتایج متفاوتی در مطالعات مختلف به دست آمده‌اند. این جهش ناشی از جابجایی نوکلئوتیدی در موقعیت ۲۷۲۲ ژن NOD2 است. فراوانی آلل جهش یافته G908R در بیماران اروپایی مبتلا به کرون از ۰/۶٪ در فنلاند تا ۱۴/۲٪ در یونان (۳۳، ۳۱) متفاوت بوده است. نسبت به دو جهش دیگر، موتاسیون G908R به طور کلی در اکثر جمعیت‌ها فراوانی کمتری دارد. کم بودن فراوانی آللهای جهش یافته G908R و 1007fsinsC در جمعیت ایرانی، با نتایج به دست آمده در کشورهای آسیایی دور از جمله چین، کره و ژاپن شباهت دارد. فراوانی سه جهش شایع ژن NOD2 در جمعیت‌های مذکور چه در بیماران مبتلا به کرون و چه در افراد شاهد سالم بسیار پایین گزارش شده است (۲۲-۱۹).

Archive of SID
www.SID.ir

در مطالعات قبلی جهش‌های شایع ژن NOD2 با گرفتاری ایلئوم انتهایی و فیبروز و تنگی این ناحیه همراهی داشته‌اند (۳۴). ولی از بین این جهش‌ها، تنها موتاسیون R702W که در مطالعه حاضر در بیماران مبتلا به کرون بیش از گروه شاهد به دست آمده است، با فنوتیپ خاصی از بیماران کرون در بیماران ایرانی همراهی نداشته‌اند. این موضوع اهمیت بررسی تعداد بیشتری از بیماران را مطرح می‌نماید.

با توجه به روش دقیق بررسی ژنومی به کار رفته در مطالعه حاضر (Sequencing) می‌توان از پایین بودن فراوانی جهش‌های G908R و 1007fsinsC در بیماران مبتلا به کرون و افراد سالم جمعیت ایرانی اطمینان داشت. از آنجایی که فراوانی جهش R702W در بیماران ایرانی مبتلا به کرون بیش از گروه شاهد سالم به دست آمده است، احتمال دارد سایر نواحی ژن NOD2 نیز در جمعیت ایرانی دارای جهش‌هایی باشد که با استعداد ابتلا به بیماری کرون همراهی داشته باشند. البته برای تایید نتایج این مطالعه، بررسی تعداد بیشتری از بیماران در مطالعات بعدی ضروری است.

ژن NOD2 پروتئین NOD2 را کد می‌کند که این پروتئین گیرنده‌ای داخل سلولی از نوع Pattern recognition است و در تنظیم ایمنی ذاتی، از طریق شناسایی قطعات داخل سلولی میکروارگانیسم‌ها از جمله لیپوپلی ساکاریدها (LPS) و پپتیدوگلیکان‌ها (PGN) نقش دارد (۱۰). همچنین پروتئین NOD2 در مرگ برنامه ریزی شده سلولی، فعال کردن فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF-kB) و ایجاد پاسخ ایمنی در سلول‌های اپی‌تلیال موثر است. از آنجایی که NF-kB نقشی کلیدی در التهاب بازی می‌کند، پروتئین NOD2 به عنوان ماده‌ای پیش التهابی مطرح می‌باشد (۱۱). با در نظر گرفتن عملکرد پروتئین NOD2 و اینکه ژن NOD2 اولین ژن شناخته شده، در ارتباط با بیماری کرون می باشد و همراهی جهش‌های آن با استعداد ابتلا به بیماری کرون در بسیاری مطالعات به اثبات رسیده است؛ مطالعه بیشتر جهش‌های این ژن در بیماران ایرانی مبتلا به کرون می‌تواند به روشن شدن زمینه ژنتیکی پاتوژنز بیماری التهابی روده (به خصوص کرون) در ایران کمک نماید. در مرحله بعد بررسی سایر اگزون‌های ژن NOD2، اینترون‌ها و مناطق اتصال اینترون‌ها به اگزون‌ها در این ژن، احتمالاً به یافتن جهش‌هایی که ممکن است با بیماری کرون مرتبط باشند، کمک می‌نماید.

REFERENCES

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 2002; 347: 417-29.
2. Aghazadeh R, Zali MR, Bahari A, Amin K, Ghahghaie F, Firouzi F. Inflammatory bowel disease in Iran: a review of 457 cases. J Gastroenterol Hepatol 2005; 20: 1691-95.
3. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2003; 124: 521–36.
4. Hugot JP, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, et al. Clustering of Crohn's disease within affected sibships. Eur J Hum Genet 2003; 11: 179–84.
5. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature 1996; 379: 821–3.
6. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K *et al.* Two stage genomewide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and12. Nat Genet 1996; 14: 199–202.
7. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001; 411: 603–606.
8. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001; 411: 599–603.
9. Ahmad T, Tamboli CP, Jewell DP, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. Gastroenterology 2004; 126: 1533–49.
10. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem 2003; 278: 8869-72.
11. Hugot JP. Genetic origin of IBD. Inflamm Bowel Dis 2004; 10: S11-15.
12. Lichtenberger GS, Flavell RA, Alexopoulou L. Innate immunity and apoptosis in IBD. Inflamm Bowel Dis 2004; 10: S58-62.
13. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet 2002; 70: 745–47.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. Am J Gastroenterol 2004; 99: 2393-404.

15. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002; 122: 867–74.

16. Vermiere S, Wild G, Kocher K , Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. Am J Hum Genet 2002; 71: 74–83.

17. Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. Gastroenterology 2002; 122: 2091–92.

18. Tukel T, Shalata A, Present D, Rachmilewitz D, Mayer L, Grant D, et al. Crohn disease: frequency and nature of CARD15 mutations in Ashkenazi and Sephardi/Oriental Jewish families. Am J Hum Genet 2004; 74: 623-36.

19. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2002; 123: 86–91.

20. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. J Hum Genet 2002; 47: 469–472.

21. Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, Huse K, Frenzel H, Stoll M, et al. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. Eur J Hum Genet 2003; 11: 6–16.

22. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 1465–70.

23. Derakhshan F, Naderi N, Farnood A, Firouzi F, Habibi M, Rezvany MR, et al. Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients. Indian J Gastroenterol 2008; 27: 8-11.

24. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1989; 170: S2-6.

25. Malchow H, Ewe K, Brandes JW, Goebell H, Ehms H, Sommer H, et al. European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. Gastroenterology 1984; 86: 249–66.

26. Monkholm P, Binder V. Clinical features and national history of Crohn's disease. In: Sartor RB, Sandborn WJ, Eds. Kirsner's Inflammatory Bowel Disease. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004. P.289-300.

27. Sambrooks J, Fritsch EF, Manitis T, Eds. Molecular cloning, laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1992.

28. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nuñez G. Human NOD1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. J Biol Chem 2001; 276: 2551–54.

29. Colombel JF. The CARD15 (also known as NOD2) gene in Crohn's disease: are there implications for current clinical practice? Clin Gastroenterol Hepatol 2003; 1: 5–9.

30. Lakatos L, Lakatos PL, Willheim-Polli C, Reinisch W, Ferenci P, Tulassay Z, et al. NOD2/CARD15 mutations and genotype-phenotype correlations in patients with Crohn's disease. Hungarian multicenter study. ORV Hetil 2004; 145: 1403-11.

31. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. World J Gastroenterol 2005; 11: 681-85.

32. Gazouli M, Zacharatos P, Panayotis A, Mantzaris G, Gerassimos JB, Barbatis, et al. Association of NOD2/CARD15 variants with Crohn's disease in a Greek population. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004; 16: 1177-82.

33. Heliö T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familially occurring and complicated forms of Crohn's disease. Gut 2003; 52: 558–62.

34. Büning C, Genschel J, Bühner S, Krüger S, Kling K, Dignass A, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. Aliment Pharmacol Ther 2004; 19: 1073–78.

35. Vavassori P, Borgiani P, Biancone L, D'Apice MR, Blanco Gdel V, Vallo L, et al. CARD15 mutation analysis in an Italian population: Leu1007fsinsC but neither Arg702Trp nor Gly908Arg mutations are associated with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2004; 10: 116-21.

Archive of SID

www.SID.ir