مقـــاله تحقیقی

بررسی کمّی تغییرات بیان ژن‌های CXCL10 و CXCL11 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

ماهرخ حق بین[1]، محمد رستمی تژاد[2]، فلورا فروزش[1*]، حمید اسد زاده عقدایی[3]، محمد امین پور حسین قلی[2]

[1] گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[2] مرکزتحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[3] مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های گوارش، پژوهشکده گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

* نشانی نویسنده مسئول:

گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، تهران، ایران.

تلفن: ۷-۲۲۰۰۶۶۶۰-۰۲۱

نشانی الکترونیک:
f8forouzesh@gmail.com

زمینه: بیماری سلیاک یک اختلال سیستم ایمنی وابسته به لنفوسیت های T است. مطالعات اخیر نقش کموکاین های CXCL10 و CXCL11 را نشان می دهد که عامل ورود سلول های ایمنی به بافت های التهابی و فراخوانی لنفوسیت ها به محل التهاب در بیماران مبتلا به سلیاک است. لذا هدف از این مطالعه طراحی پرایمرهای اختصاصی برای بررسی ژن‌های CXCL10 و CXCL11 با تکنیک PCR در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک و بررسی کمی بیان این دو ژن در خون این بیماران در مقایسه با افراد سالم کنترل است.

روش کار: در این مطالعه از ۱۰ بیمار مبتلا به سلیاک که بیماری آنها توسط آزمایشات پاتولوژی و نظر متخصص گوارش تایید شده بود و همچنین از ۱۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل نمونه خون اخذ گردید. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، برای نواحی ثابت ژن‌های CXCL10و CXCL11 پرایمرهای اختصاصی exon-exon junction طراحی و PCR انجام گردید و بررسی بیان این دو ژن با تکنیک Real-time PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: با توجه به نتایج به دست آمده همه پرایمرهای طراحی شده دارای قابلیت بالایی از نظر تکثیر قطعات مورد نظر می باشند و همچنین افزایش بیان معنادار در بیان دو کموکاین CXCL10 و CXCL11 در بیماران مبتلا به سلیاک در مقایسه با افراد کنترل مشاهده شد ($p< ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که تغییر در بیان ژن های CXCL10 و CXCL11 در بیماران مبتلا به سلیاک نشان دهنده نقش سیستم ایمنی ذاتی در پاتوژنز بیماری سلیاک است.

واژگان کلیدی: بیماری سلیاک، جفت پرایمر اختصاصی، کموکاین

مقدمه

بیماری سلیاک (CD)[1] بیماری التهابی مزمن روده باریک وابسته به سلول های T سیستم ایمنی بدن است و یک اختلال خود ایمنی است که در اثر ازدیاد حساسیت به پروتئین گلوتن (پروتئین موجود در گندم و جو) در افرادی که از لحاظ ژنتیکی مستعد هستند، ایجاد می‌شود (۱). متعاقب این واکنش التهابی در روده کوچک، آتروفی ریز پرزها، هیپرپلازی مخاط و ارتشاح لنفوسیتی ایجاد می شود. حذف گلوتن از رژیم غذایی منجر به بهبود بالینی و بافت شناسی به طور کامل می شود. گلوتن در افراد مستعد ژنتیکی باعث آغاز پاسخ های ایمنی اکتسابی میشود. قویترین ارتباط ژنتیکی در بیماری سلیاک، همراهی آن با مجموعه HLA-II است و در اواخر سال ۱۹۸۰ مشخص شد که این همراهی با لوکوس HLA-DQ می‌باشد (۵-۲). در این میان، بیشترین ارتباط با HLA-DQ2 و HLA-DQ8 دیده شده است (۵).

تاکنون مطالعات انجام شده در خصوص علل ایجاد بیماری سلیاک نشان داده اند که سیستم ایمنی محور اصلی پاسخ ها و عوارض پاتولوژیک ایجاد شده علیه گلوتن مصرفی می باشد (۸-۶). همچنین با وجود عملکرد مهم ایمنی اکتسابی طی فرآیند بیماریزایی، مشخص شده که ایمنی ذاتی دارای نقش بسزایی در شروع شکل‌گیری پاسخ‌های ایمونولوژیک می‌باشد. در بیماری سلیاک از میان مکانیسم‌های دخیل در سیستم ایمنی ذاتی، مسیر پیام‌رسانی کموکاین‌ها نقش بسزایی در ایجاد بیماری دارند (۱۰ , ۹).

کموکاین‌ها به چهار گروه CX3C، CXC،CC و XC تقسیم‌بندی می‌شوند که همگی آن‌ها دارای ویژگی‌های ساختاری مشابهی همچون اندازه کوچک ۸ تا ۱۰ کیلودالتونی و وجود چهار مولکول سیستئین در جایگاه‌های کلیدی ساختاری هستند (۹).

CXCL10 (IP-10) و CXCL11 (I-TAC) (IP-9) کموکاین‌هایی از خانواده CXC هستند، که به گیرنده خود یعنی CXCR3 که از خانواده G پروتئین‌ها است متصل می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که CXCR3 و لیگاندهای آن یکی از محورهای اصلی فراخواندن سلول‌ها به بافت التهابی هستند و همچنین ارتباط قوی با بیماری‌های خودایمنی از قبیل بیماری سلیاک دارند (۱۱).

ژن CXCL10 و CXCL11 روی کروموزوم ۴ قرار گرفته است و توسط T سلول های NKT[2]، CD4+ NK، مونوسیت، سلول های دندرتیک، فیبروبلاست، اندوتلیال و اپیتلیال تولید می شود و نیز IFN-γ باعث تحریک ترشح این کموکاین‌ها از سلول‌ها می‌شود (۱۲).

هدف از این مطالعه طراحی جفت پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های CXCL10 و CXCL11 و بررسی کمّی تغییرات بیان این ژن‌ها در نمونه خون بیماران مبتلا به بیماری سلیاک می باشد.

روش کار

در این مطالعه از ۱۰ بیمار مبتلا به سلیاک که به بخش بیماری سلیاک واقع در مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی مراجعه کرده و بیماری آنها با استفاده از تست های پاتولوژی و نظر پزشک متخصص تأیید شده، با کسب رضایت آگاهانه، حدود ۱۰-۸ سی سی خون محیطی گرفته و در لوله حاوی ضد انعقاد جمع آوری شد. همچنین نمونه خون ۱۰ فرد سالم بعنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج RNA

در این مطالعه، استخراج RNA از نمونه‌ها، بوسیله کیت شرکت یکتا تجهیزآزما (ایران- شماره کاتالوگ YT9065) طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. سپس RNA استخراج شده به یک لوله جدید RNAase -free حاوی ۶۰ میکرو لیتر آب بدون RNAase منتقل شد و در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. پس از استخراج، کمیت و کیفیت RNA به ترتیب با استفاده از دستگاه نانو دراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱% بررسی گردید. در این دستگاه جذب نوری محلول RNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر قرائت شد.

سنتز cDNA

cDNA با استفاده از کیت Takara (ژاپن، شماره کاتالوگ RR037A) طبق دستورالعمل کیت از روی نمونه‌های RNA استخراج شده، ساخته شد. به این ترتیب ۲۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراجی برای ازبین بردن ساختارهای ثانویه، به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از اتمام این زمان، بلافاصله روی یخ قرار داده شد. سپس ترکیبات شامل ۲ میکرولیتر بافر 5X primeS-cript، ۰/۵ میکرولیتر میکس PrimeScript RT ۱ ، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Oligo dT، ۰/۵ میکرولیترپرایمر Random 6 mers، ۰/۵میکرولیتر آب RNase Free، به آن اضافه گردید. حجم نهایی معادل ۱۰ میکرولیتر بود که تحت برنامه دمایی زیر قرار گرفت: ابتدا در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، سپس نسخه برداری معکوس (RT) در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵دقیقه، انجام شد و مرحله نهایی افزایش طول زنجیره DNA Final extention در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. نمونه‌های cDNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند.

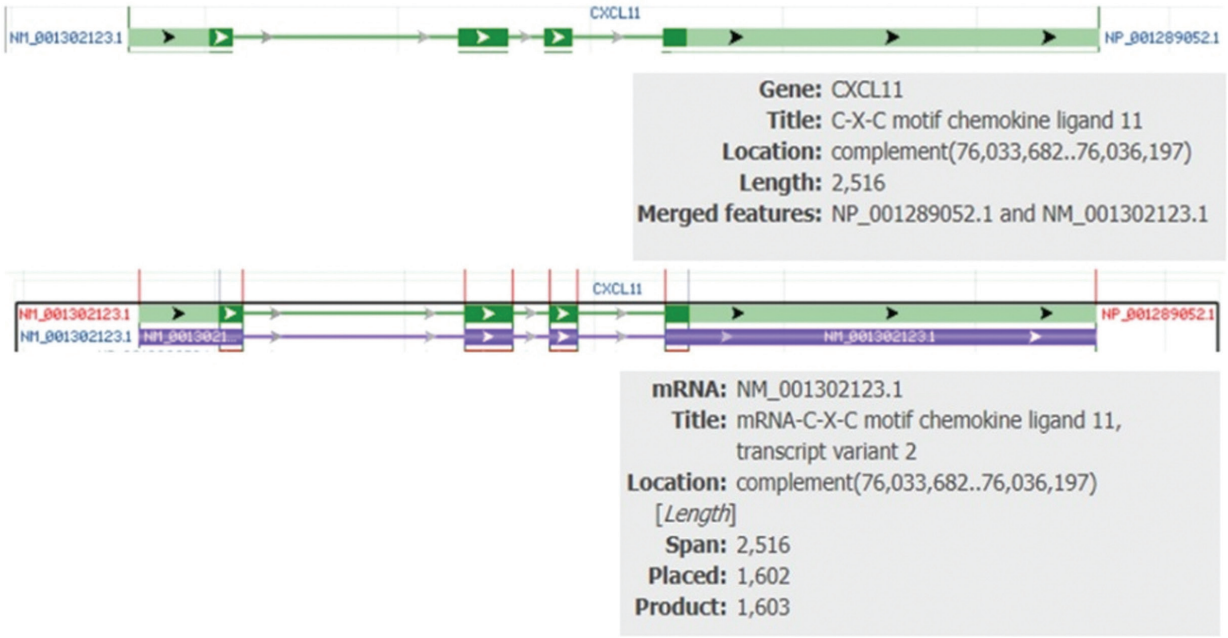
طراحی پرایمر

برای طراحی پرایمرها از نرم افزار طراحی پرایمرها با استفاده از داده های ژنوم انسان، موجود در پایگاه اطلاعاتی GeneBank استفاده

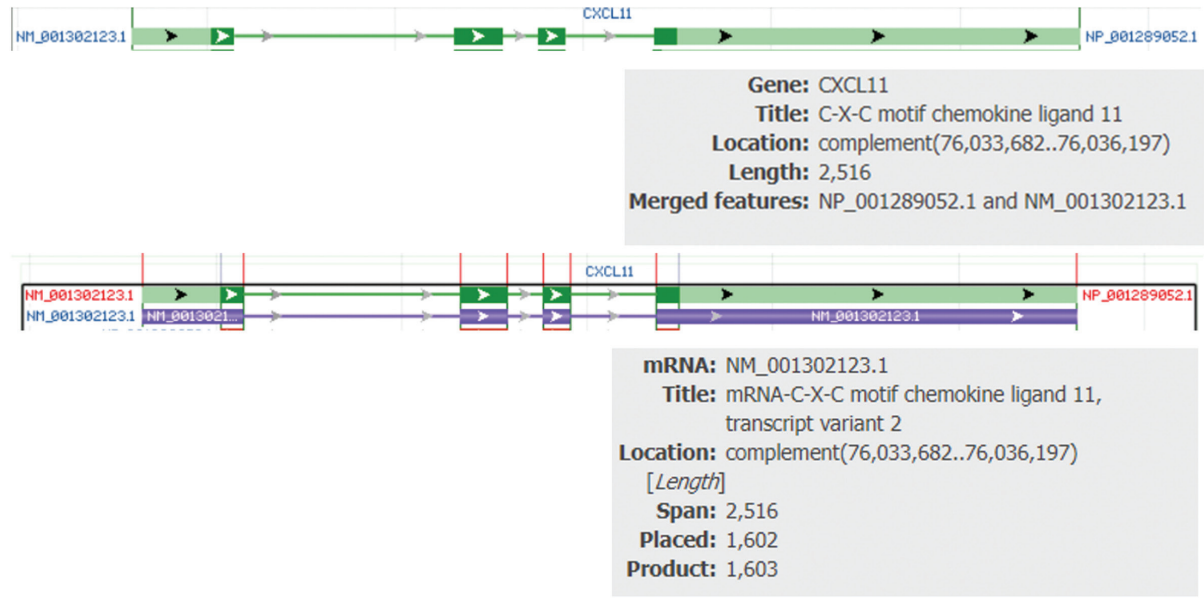
۱. Celiac disease
۲. Natural killer T cells

شد. از آنجائیکه این پرایمرها اختصاصی بوده و برای مطالعه عملکرد ژن طراحی شدند، از مناطق کدکننده به عنوان توالی های اولیه برای طراحی پرایمر استفاده گردید.

ژن های مورد مطالعه شامل CXCL10 و CXCL11 بود که تا امروز پرایمرهایی برای آن‌ها در جمعیت مبتلا به سلیاک ایران طراحی نشده و این کار برای اولین بار در ژنوم این بیماران در ایران صورت گرفت. برای طراحی پرایمر ها از نرم افزار Gene Runner نسخه۶ استفاده شد و سپس بررسی های بیوانفورماتیکی جهت تایید آن انجام شد. برای این منظور در پایگاه اطلاعاتی NCBI در بخش primer Blast و Nucleotide Blast اختصاصی بودن این پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. مدل ژنی و منطقه کد کننده ژن CXCL11 در شکل۱، و مدل ژنی و منطقه کد کننده ژن CXCL10 در شکل۲، نشان داده شده است. مناطق کد کننده به صورت رنگی نمایش داده شده اند.



شکل ۱: ژن CXCL11 و منطقه کد کننده ژن CXCL11 در انسان. موقعیت کروموزومی این ژن 4q21.1 می باشد و حاوی ۴ اگزون است https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/ 637



شکل ۲: ژن CXCL10 و منطقه کد کننده ژن CXCL10 در انسان. موقعیت کروموزومی این ژن 4q21.1 می باشد و حاوی ۴ اگزون است (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/ 3627).

برای هر کدام از ژن‌های CXCL10 و CXCL11 یک پرایمر مناسب در نواحی اتصال بین دو اگزون (exon-exon junction) طراحی شد. به طور کلی طول پرایمرهای طراحی شده ۲۰-۲۲ جفت باز بود که مناسب ترین طول برای PCR است. علاوه بر این، دمای ذوب پرایمرها در محدوده ۶۱-۵۶ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد. برای اطمینان از حداکثر ثبات محصول، پرایمرها حاوی حدود ۵۰ تا ۵۵ درصد GC بودند. حضور نوکلئوتیدهای G و C در انتهای "۳پرایمر (GC clamp) به دلیل اتصال قوی‌تر G و C باعث افزایش خاصیت اتصال در پایانه "۳ می شود. پرایمرهای لیوفیلیز شده در یک حجم مشخصی از آب دیونیزه شده حل شدند به طوری که غلظت نهایی معادل pmol /µl ۱۰۰ می باشد. برای جلوگیری از ذوب و انجماد مکرر، محلول های حاوی pmol /µl ۱۰ آماده شد. سپس تمام محلول های پرایمر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمراز (تکنیک PCR)

واکنش PCR برای ژن های CXCL11، CXCL10 با استفاده از PCR Master mix Kit یکتا تجهیزآزما (ایران- شماره کاتالوگ YT۱۵۰۱) انجام گرفت. مراحل PCR با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت 10X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار ۰/۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase با غلظت 5U، ۱ میکرولیتر cDNA و ۱میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول انجام شد. این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر (Thermal Cycler،Mastercycler، Ep-pendorf AG، Germany ،Hamburg) و با شرایط دمایی یکسان برای هر دو ژن قرار گرفت و با برنامه واسرشتگی اولیه در دمای۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل با برنامه واسرشتگی در دمای۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به هدف در دمای ۵۹/۷ درجه سانتیگراد مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه طویل شدن در دمای ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱دقیقه انجام گرفت. پس از اتمام زمان PCR، محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک و نیم درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. در ژل آگارز، قطعات DNA برحسب اندازه از یکدیگر جدا می شوند و درون ژل حرکت می کنند، در انتها برای دیدن باندها از دستگاه ژل داک BIORAD استفاده گردید. برای اطمینان از صحت انجام PCR، از کنترل منفی استفاده شد. کنترل منفی حاوی مواد مورد نیاز PCR بدون cDNA بود.

آنالیز آماری

در این مطالعه، بررسی میزان تغییرات بیان ژنهای مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل با روش Fold change صورت گرفت. این روش به منظور محاسبه تغییرات کمّی در میزان بیان ژن انجام شده است و سطح بیان mRNA ژنهای هدف با سه مقدار RQ مورد محاسبه قرار گرفته است. میزان تغییرات بیان ژن هدف با بیان ژن کنترل داخلی (B2MG)[۳] نرمال شده و با میزان بیان ژن در نمونه کالیبراتور به صورت نسبی بررسی شده است. درواقع ارتباط معنادار در میزان بیان ژن‌های، CXCL10 CXCL11 بین گروه بیمار و کنترل توسط مقادیر RQ بدست آمده مورد سنجش قرار گرفت. بدین صورت که RQ < ۰/۵ بیانگر کاهش بیان ژن، RQ > ۲ نشان دهنده افزایش بیان ژن و ۰/۵ < RQ <۲ بیانگر عدم تغییر بیان ژن در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل می باشد. علاوه بر این با بهره گیری از نرم افزار GraphPad, Prism (V.6)منحنی نتایج حاصل از Real-time PCR رسم گردید.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل مولکولی ژن‌های CXCL10 و CXCL11 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک با استفاده از PCR و جفت پرایمرهای اختصاصی که برای اولین بار در جمعیت سلیاکی ایران طراحی شده انجام شد که توالی این پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. به منظور بهینه سازی PCR گرادیانت دمایی برای هر

جدول۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن های CXCL10، CXCL11

ژن	توالی پرایمر		طول قطعه ایجاد شده (جفت باز)	accession number
CXCL10	Forward reverse	AGTGGCATTCAAGGAGTACC GCAATGATCTCAACACGTGG	۱۴۳	KJ897060.1
CXCL11	Forward reverse	GCCTCCATAATGTACCCAAG GCCTTGCTTGCTTCGATTTG	۱۰۹	KJ905914.1

۳. Beta-2-Microglobulin

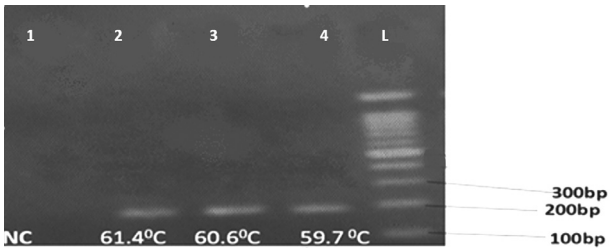
یـک از پرایمرهای مورد مطالعه گذاشـته شـد و سـپس برای بررسـی عملکـرد پرایمرهـا جهـت تشـخیص و تکثیر ایـن ژن هـا در بیماران مبتـلا به سـلیاک، محصـولات PCR بـا اسـتفاده از روش الکتروفورز روی ژل۱/۵ درصد آگارز بررسـی گردید. شـکل ۳و۴ قطعات تکثیری دو ژن مورد مطالعه کـه توسـط پرایمرهای اختصاصی هر ژن تکثیر شـدند را نشـان مـی‌دهـد. انـدازه قطعه تکثیر شـده بـرای ژن‌های CXCL11 و CXCL10 بـر روی ژل آگارز بـه ترتیـب اندازه‌هـای ۱۰۹ و ۱۴۳ جفـت بـاز مـی باشـد. بـا توجـه بـه ایـن کـه در واکنش PCR، درکنترل منفی باندی مشـاهده نشـد، وجود باند در نمونه بیمار تایید کننده اختصاصیت باند و عدم وجود آلودگی اسـت. همـانگونـه کـه در شـکل ملاحظه می گردد در هر دو ژن، پرایمرهـا قـادر بـه تکثیـر منطقـه مـورد نظـر ژن بودند. ضمناً با مشـاهده تـک باند قوی برای هر پرایمر می تـوان اسـتنباط نمـود کـه شـرایط بهینه برای واکنش PCR وجـود داشـته و نکـات اصـلی در طراحی هر پرایمر شـامل اندازه پرایمر، دمـای Tm و میـزان GC به درسـتی انتخاب شـده است کـه بـه ایـن ترتیـب از تکثیـر قطعات غیر اختصاصی و پرایمـر دایمرها جلوگیـری گردید.

بررسی کمّی بیان ژن‌های CXCL10 وCXCL11

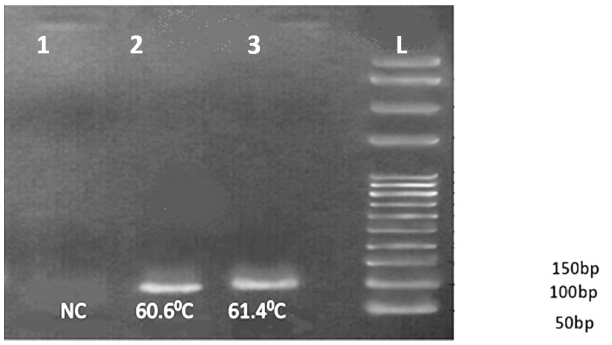
به منظور بررسی کمی تغییرات بیان ژن های مذکور بین دو گروه بیمار و کنترل سالم از روش کمیت سنجی نسبی (Realative Quantitative) استفاده شد. از آنجاییکه SYBR Green به تنهایی قادر به تمایز بین محصولات اختصاصی و غیراختصاصی نیست به منظور یافتن دمای اتصال مناسب برای پرایمرهای مورد مطالعه و اطمینان از عدم حضور پیک های غیراختصاصی از منحنی ذوب[۴] استفاده شد. در شکل ۵ نتایج منحنی ذوب نشان داد که هر دو جفت پرایمر CXCL10 و CXCL11 به صورت اختصاصی عمل می‌کند. همچنین از ژن B2M به عنوان ژن رفرنس استفاده گردید که منحنی ذوب پرایمرهای مربوط به این ژن نیز اختصاصی بودن آن‌ها را تایید می‌کند.

نتایج مربوط به منحنی تکثیر[۵] ژن‌های هدف و همچنین (B2MG) در شکل‌های۶ و ۷ آورده شده است که نتایج نشان داد که تکثیر به خوبی صورت گرفته است.

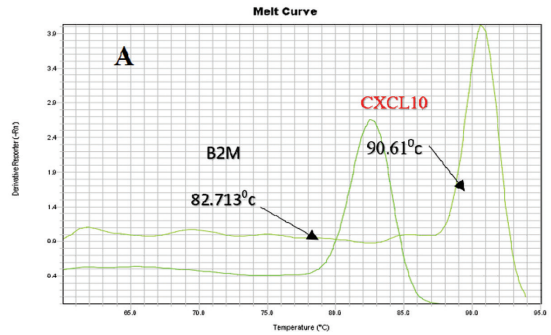
میزان بیان ژن CXCL10 و CXCL11 در دوگروه بیمار و کنترل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح بیان رونوشت ژن‌های CXCL10و CXCL11 در بیماران مبتلا به سلیاک نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است (RQ >۲) که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (شکل ۸).

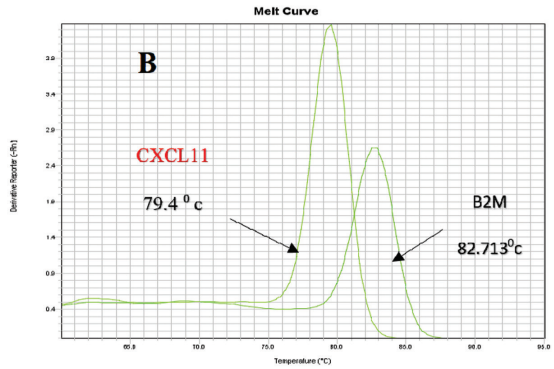


شکل۳: الکتروفورز محصول PCR گرادیان دمایی Tm، برای ژن CXCL10 روی ژل آگارز۱%/۵. چاهک ۱: کنترل منفی (به جای cDNA از آب استفاده شد)، چاهک ۲ الی ۴: محصول PCR بیمارسلیاکی،: L Ladder 100 bp (یکتا تجهیز آزما–شماره کاتالوگ YT8503)، باند مورد نظرbp ۱۴۳ می باشد.



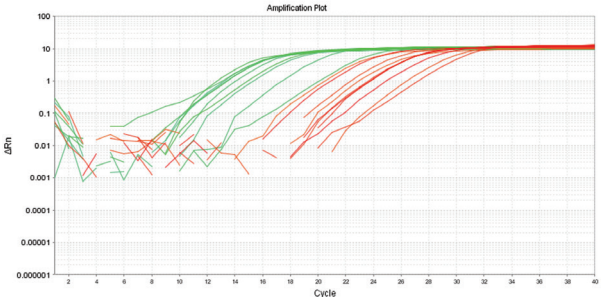
شکل۴: الکتروفورز محصول PCR گرادیان دمایی Tm ، برای ژن CXCL11 روی ژل آگارز۱%./۵ چاهک ۱:کنترل منفی (به جای cDNA از آب استفاده شد)، چاهک ۲ و ۳: محصول PCR بیمارسلیاکی،Ladder 50 bp (یکتا تجهیز آزما Cat:YT8501)، باند مورد نظر bp109 می باشد.



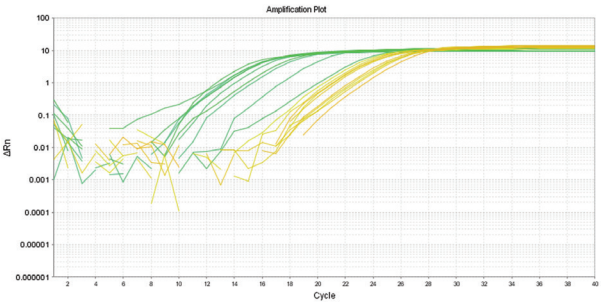


شکل ۵: منحنی ذوب اختصاصی هر پرایمر . A: منحنی ذوب پرایمر ژن CXCL10 در دمای ۹۰/۶۱ درجه سانتی گراد . B: منحنی ذوب پرایمر ژن CXCL11 در دمای ۷۰/۴ درجه سانتی گراد . ژن B2M، به عنوان ژن رفرنس با دمای ذوب ۸۲/۷۱ درجه سانتی گراد

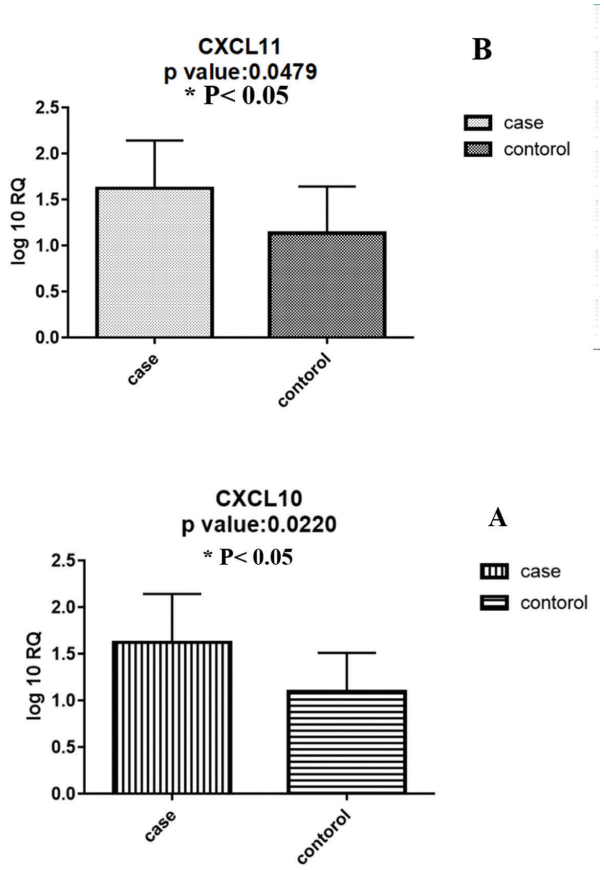
۴. Melting curve
۵. Amplification Plot



شکل۶: منحنی تکثیر تصاعدی ژن های CXCL10 و B2M برحسب (سیکل–ΔRn) در بیماران مبتلا به سلیاک و افراد سالم.



شکل۷: منحنی تکثیر تصاعدی ژن های CXCL11 و B2M برحسب (سیکل–ΔRn) در بیماران مبتلا به سلیاک و افراد سالم.



شکل ۸: میزان تغییرات بیان ژن های هدف در افراد مبتلا به سلیاک در مقایسه با افراد سالم. A) تغییرات بیان ژن CXCL11
B) تغییرات بیان ژن CXCL10.

بحث

در سال های اخیر شواهد و مدارک علمی قابل ملاحظه ای جهت بررسی علل اصلی بیماری CD معرفی شده است. طبق شواهد موجود، همانند بسیاری از بیماری‌های خودایمن، محیط و ژنتیک به عنوان عوامل اصلی آغازگر این بیماری شناخته شده‌اند (۱۴ و ۱۳). اما اخیراً مطالعات انجام شده پیرامون عملکرد سیستم ایمنی در پاتوژنز بیماری CD نشان می‌دهد که این بیماری التهابی مخاط روده با دخالت سیستم ایمنی ایجاد شده و در این بین سیستم ایمنی ذاتی دارای سهم قابل توجهی در پاسخ های شکل گرفته در برابر مخاط روده می‌باشد (۱۵). یکی از انحصاری‌ترین ویژگی‌های سیستم ایمنی نسبت به سایر سیستم‌های بافتی حرکت و مهاجرت کاملا منظم سلول‌ها از خون به بافت‌ها و برعکس است که توسط پروتئین‌هایی که دارای ویژگی‌های ساختاری مشابهی همچون اندازه کوچک (۸ تا ۱۰ کیلو دالتون) و وجود چهار مولکول سیستئین در جایگاه‌های کلیدی ساختاری هستند و به عنوان کموکاین طبقه بندی می‌شوند صورت می گیرد (۱۶, ۱۵, ۱۳). در این مطالعه، ژن‌های CXCL10 و CXCL11 به عنوان هدایت کننده اصلی پاسخ‌های ایمنی ذاتی، به ویژه در نمونه‌های خون بیماران سلیاکی با جفت پرایمرهای اختصاصی که برای اولین بار در جمعیت این بیماران در ایران طراحی شدند، معرفی گردید. ژن کموکاین‌های CXCL10 و CXCL11 در بازوی بلند کروموزوم ۴ قرار دارد و دارای پروموترهای مشابه هستند و بیان آن‌ها توسط مسیر های فعال سازی مشابه القا می شود و به گیرنده اختصاصی خود (CXCR3) متصل می‌شوند (۱۸, ۱۷).

در مورد بیان ژن‌های این کموکاین‌ها و گیرنده آن‌ها در بیماران مبتلا به سلیاک مطالعات محدودی صورت گرفته است. در سال۲۰۱۴ در آرژانتین، تغییرات بیان ژن‌های CXCL10/CXCR3 در ۲۶ بیمار سلیاکی درمان نشده و ۶ بیمار درمان شده مورد بررسی قرار گرفت که افزایش بیان این دو ژن را در بیماران سلیاکی نشان داد. محققین این تحقیق به این نتیجه رسیدند که تولید CXCL10 در اپیتلیوم و لامینا پروپریای بیماران سلیاکی درمان نشده توسط سلول های انتروسیت و پلاسماسل افزایش یافته است که مطابق نتایج مطالعه حاضر در این تحقیق است (۱۰).

Booth و همکاران نیز در مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که کموکاین‌های CXCL10،CXCL11 در بیماری‌های خودایمنی باعث فراخوانی لوکوسیت‌ها به محل التهاب و فعال شدن آن‌ها می‌شوند. با توجه به این موضوع که بیماری سلیاک یک بیماری خود ایمن بوده و با توجه به نتایج مطالعه حاضر مبنی بر مشاهده باندهای قوی ژن‌های این کموکاین‌ها، می‌توان نتیجه گرفت بیماری سلیاک نیز همانند سایر بیماری‌های خود ایمن در این دو ژن مذکور احتمالا افزایش بیان دارد(۱۹).

مطالعه‌ای در سوئد توسط Bragde در سال ۲۰۱۴ بر روی ۲۰ بیمار فعال سلیاکی که دارای علائم پاتولوژی بیماری بودند و ۱۵ بیمار سلیاکی بدون علائم با پاتولوژی طبیعی و ۱۴ فرد سالم انجام شد. محققین در این مطالعه میزان بیان رونوشت ژن‌های مربوط به کمو کاین‌ها، سایتوکاین‌ها و فاکتورهای نسخه‌برداری را بررسی کردند و ارتباط معناداری میان بیان تعدادی از آن ها و بیماری سلیاک مشاهده کردند و در نهایت تعدادی از آن ها را به عنوان مارکر تشخیصی بیماری سلیاک معرفی کردند. به عنوان مثال مطابق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، در این تحقیق مشاهده شد CXCL11 در بیماران مبتلا به سلیاک میزان بیان ژنی بیشتری دارد(۲۰).

مطالعه Rashtak و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که پروتئین گلوتن موجود درغلات، قادر به تحریک مونوسیت‌های خون در تولید بیشتر کموکاین‌ها از قبیل CXCL10 می‌باشند و همراستا با مطالعه ما افزایش بیان در این کموکاین مشاهده گردید. محققین با بررسی نقش این کموکاین‌ها در بیماران سلیاکی مشاهده کردند که آن ها نقش اساسی در فراخوانی لنفوسیت‌های T به اپیتلیوم داشته و در آینده به عنوان هدف درمانی برای بیماران سلیاکی و حتی بیماران حساس به گلوتن غیر سلیاکی کاربرد دارد. در مطالعه ما نیز افزایش بیان کموکاین CXCL10 در بیماران سلیاکی مشاهده شد (۲۱).

در مطالعه Valerii و همکاران مشاهده شد که در بیماران حساس به گلوتن غیر سلیاکی، سلول های تک هسته خون محیطی(PBMC)[۶] کموکاین پیش التهابی CXCL10 را در حضور گلوتن گندم به میزان زیادی بیان می کنند و سبب فراخوانی سلول ها به بافت التهابی می شوند. این مطالعه نقش مهم این کموکاین را در زمان التهاب نشان می دهد و با توجه به این موضوع که بیان این کموکاین در بیماران حساس به گلوتن غیر سلیاکی نیز افزایش بیان داشته و با استناد به نتایج مطالعه حاضر می‌توان اینگونه بیان کرد که افزایش بیان این کموکاین با افزایش گلوتن رابطه مستقیم دارد (۲۲).

در نتیجه مطالعه ما نشان داد که می توان از نمونه خون بیماران مبتلا به سلیاک برای بررسی بیان ژن‌های CXCL10 و CXCL11 با جفت پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق که به طور اختصاصی این ژن‌ها را تکثیر می‌دهند، استفاده کرد. نتایج بررسی کمی تغییر بیان این ژن‌ها در بیماران سلیاکی در مقایسه با افراد نرمال نشان داد که از این ژن‌ها می‌توان به عنوان بیومارکرهای تشخیصی استفاده نمود که برای این منظور باید مطالعات تکمیلی صورت پذیرد.

تقدیر و تشکر

از مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در انجام مطالعه ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مراجع

1. Ehsani-Ardakani MJ, Rostami Nejad M, Villanacci V, Volta U, Manenti S, Caio G, et al. Gastrointestinal and non-gastrointestinal presentation in patients with celiac disease. Arch Iran Med. 2013;16(2):78-82.

2. Biagi F, Bianchi PI, Vattiato C, Marchese A, Trotta L, Badulli C, et al. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on severity in celiac Disease. J Clin Gastroenterol. 2012;46(1):46-50.

3. Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, et al. HLA related genetic risk for coeliac disease. Gut. 2007;56(8):1054-9.

4. Karinen H, Kärkkäinen P, Pihlajamäki J, Janatuinen E, Heikkinen M, Julkunen R, et al. Gene dose effect of the DQB1*0201 allele contributes to severity of coeliac disease. Scand J Gastroenterol. 2006;41(2):191-9.

5. Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. Tissue Antigens. 2003;61(2):105-17.

6. Ciclitira PJ, King AL, Fraser JS. AGA technical review on Celiac Sprue. American Gastroenterological Association. Gastroenterology. 2001;120(6):1526-40.

7. Green PH, Cellier C. Celiac disease. N Engl J Med. 2007;357(17):1731-43.

8. Ghasiyari H, Nejad MR, Amani D, Zali MR. Crucial role of innate immune system in the pathogenesis of celiac disease. Arvand Journal of Health and Medical Sciences. 2016;1(3).

9. Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. Endocr Rev. 2007;28(5):492-520.

10. Bondar C, Araya RE, Guzman L, Rua EC, Chopita N, Chirdo FG. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. PLoS One. 2014;9(2):e89068.

11. Lee EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2009;8(5):379-83.

12. Groom JR, Richmond J, Murooka TT, Sorensen EW, Sung JH, Bankert K, et al. CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. Immunity. 2012;37(6):1091-103.

13. Christen U, McGavern DB, Luster AD, von Herrath MG, Oldstone MB. Among CXCR3 chemokines, IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. J Immunol. 2003;171(12):6838-45.

14. Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Terrades-García N, Alba MA, Prieto-González S, et al. Blocking interferon γ reduces expression of chemokines CXCL9, CXCL10

۶. Peripheral blood mononuclear cell

and CXCL11 and decreases macrophage infiltration in ex vivo cultured arteries from patients with giant cell arteritis. Ann Rheum Dis. 2016;75(6):1177-86.

15. Kooy-Winkelaar Y, van Lummel M, Moustakas AK, Schweizer J, Mearin ML, Mulder CJ, et al. Gluten-specific T cells cross-react between HLA-DQ8 and the HLA-DQ2α/DQ8β transdimer. J Immunol. 2011;187(10):5123-9.

16. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol. 1997;15:675-705.

17. Alaedini A, Green PH. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. Ann Intern Med. 2005 Feb 15;142(4):289-98.

18. Iacomino G, Marano A, Stillitano I, Aufiero VR, Iaquinto G, Schettino M, et al. Celiac disease: role of intestinal compartments in the mucosal immune response. Mol Cell Biochem. 2016;411(1-2):341-9.

19. Booth V, Keizer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. Biochemistry. 2002;41(33):10418-25.

20. Bragde H, Jansson U, Fredrikson M, Grodzinsky E, Söderman J. Potential blood-based markers of celiac disease. BMC Gastroenterol. 2014;14:176.

21. Rashtak S, Marietta E, Murray J. Gliadin stimulation of monocytes leads to increased expression of multiple T cell recruiting chemokines: a novel innate immune response. Clinical Immunology. 2010(135):S47.

22. Valerii MC, Ricci C, Spisni E, Di Silvestro R, De Fazio L, Cavazza E, et al. Responses of peripheral blood mononucleated cells from non-celiac gluten sensitive patients to various cereal sources. Food Chem. 2015;176:167-74.