

پلی مورفیسم ژن CD14 در بیماران مبتلا به پولیپوز بینی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۶/۰۶

چکیده

نسرين یزدانی^۱، مهسا محمد آملی^۲
علی مرساقیان^{۱*}، علی باقری حق^۱
فروغ سیاح پور^۳، رضا فتوحی^۱

۱- مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی

۲- گروه ایمونوزنتیک، مرکز تحقیقات غدد و

متابولیسم بیمارستان دکتر شریعتی

۳- کارشناس ژنتیک، مرکز تحقیقات غدد و

متابولیسم بیمارستان دکتر شریعتی

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

زمینه و هدف: CD14 به عنوان یک گیرنده برای لیپوپلی ساکارید باکتری‌ها و شروع واکنش التهابی و نیز به عنوان گیرنده‌ای در ماکروفاژهای انسانی برای تشخیص و پاک‌سازی سلول‌های در حال مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptotic)، شناخته شده است. در افراد با مواجهه طولانی با ترکیبات میکروبی ریسک واکنش‌های آلرژیک کاهش می‌یابد و به‌طور مشخصی سطوح CD14 در سلول‌های خونی آنان بالاتر است. علیرغم این‌که علت بیماری پولیپوز به‌طور دقیق مشخص نیست ولی آلرژی همواره عامل بالقوه این بیماری مطرح شده است. CD14 در منطقه کروموزومی ۵q۳۱ واقع شده و ارتباط آن با آسم مشخص شده است. در این مطالعه اثر پلی مورفیسم ژن CD14 روی پولیپوز و شدت بیماری مذکور بررسی گردید. روش بررسی: در مطالعه حاضر ۱۰۶ فرد مبتلا به پولیپوز بینی با میانگین سنی ۴۱ سال در گروه بیمار و ۸۷ نفر با میانگین سنی ۳۶/۷ سال در گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. پس از استخراج DNA از خون، ژنوتیپ‌های مختلف CD14 با تکنیک PCR-RFLP تعیین گردید. این تحقیق به‌صورت مطالعه مقدماتی بوده و مورد مشابه قبلی نداشت. یافته‌ها: بین آلل C (CT+CC) CD14 در مقابل TT و پولیپوز بینی ارتباط معنی‌داری وجود دارد (p=۰/۰۳). در بیماران آسمی مبتلا به پولیپوز هم شیوع آلل C (CC) در مقابل CT+TT به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (p=۰/۰۱). همچنین در بیماران آسمی با آلل CD14C احتمال ابتلا به پولیپوز بیشتر بوده و نیز در بیماران مبتلا به پولیپوز شدید بینی که با Lund Mackay بالاتر مشخص می‌شوند، آلل C از ژن مذکور شیوع بالاتری دارد. نتیجه‌گیری: بین آلل C از ژن CD14 و پولیپوز بینی رابطه معنی‌داری وجود دارد.

کلمات کلیدی: پلی مورفیسم ژن CD14، پولیپوز، PCR-RFLP.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان سعدی شمالی،

بیمارستان امیراعلم

تلفن: ۶۶۷۰۶۱۰۶-۹

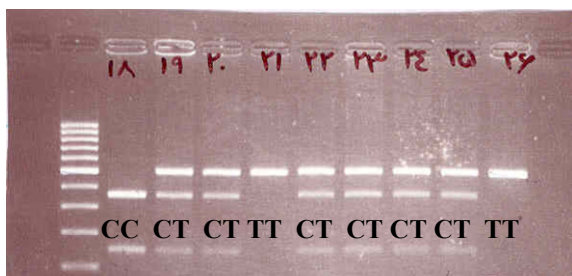
email: mersaqianali@yahoo.com

مقدمه

در شوک گرم- مثبت مرگ و میر بالایی را سبب می‌شود.^۳ Wright نشان داد که CD14 رسپتوری است که برای باند شدن کمپلکس Lipopolysaccharid-binding Protein (LPS) به‌کار می‌رود و پاسخ- های التهابی را آغاز می‌کند.^۴ بچه‌های کشاورزان در خطر کمتری جهت پیشرفت آلرژی هستند و سلول‌های خونی آنان نسبت به بچه‌های غیر کشاورزان مقادیر بالاتر CD14 را بروز می‌دهند.^۵ در مجموع مطالعات مختلفی در مورد ارتباط پلی مورفیسم CD14 با بیماری‌های آلرژیک مثل رینیت آلرژیک، آسم و افزایش حساسیت به‌واسطه Ige و حتی موارد دیگری مثل بیماری‌های قلبی عروقی، نفروپاتی‌ها و غیره انجام شده است.^{۶،۷} هدف ما از این مطالعه بررسی شیوع پلی مورفیسم ژن CD14 در بیماران پولیپوز بینی و آسم و پولیپوز همزمان بوده است.

پولیپوز (Polyposis) بیماری التهابی مزمن بینی و سینوس‌های عمده‌تاً اتمویدال می‌باشد که در آن مخاط بینی دچار تغییراتی شامل ادم، ائوزینوفیلی، تغییر در رشد مجدد مخاط و تشکیل غدد موکوسی جدید می‌شود. این بیماری چند عاملی بوده و عوامل اتیولوژیک متعددی مثل آلرژی، آسم، سینوزیت راجعه و عدم تحمل به آسپیرین در آن دخیل‌اند.^۱ جایگاه ژنتیکی CD14 روی بازوی بلند کروموزوم پنچ و محل آن در جایگاه ۳۱ (۵q۳۱) می‌باشد.^۲ CD14 یک ژن با کپی منفرد می‌باشد که دو پروتیین m CD14 (پروتیین غشایی با قلاب گلیکوزید فسفاتیدیل اینوزیتول) و S CD14 (پروتیین محلول در سرم مشتق از مونوسیت و سلول کبدی) را سنتز می‌کند. افزایش سطوح S CD14 با بیماری‌های عفونی التهابی در رابطه بوده و

روش بررسی



شکل-۱: ژل فرایند تعیین ژنوتیپ ژن CD14 با استفاده از روش PCR-RFLP

جزئیات مربوط به تعیین ژنوتیپ به روش فوق در مراجع ژنتیک موجود است. سکانس ناحیه پروموتور آن در شکل ۱ نشان داده می‌شود. با توجه به اطلاعات به دست آمده، شیوع پلی مورفیسم C/C، C/T، T/T در هر گروه محاسبه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۱/۵ آنالیز آماری انجام شد. با استفاده از تست χ^2 رابطه این پلی مورفیسم‌ها با بروز بیماری بررسی شد. در این مطالعه $p < 0.05$ از ارزش آماری برخوردار است.

یافته‌ها

در گروه بیمار ۱۰۶ نفر بیمار مبتلا به پولیپوز بینی با میانگین سنی ۴۱ سال و در گروه کنترل ۸۷ فرد غیر بیمار به صورت با میانگین سنی ۳۶/۷ سال قرار گرفتند. در گروه بیمار ۲۵ زن و ۸۱ مرد به ترتیب با درصد ۲۳/۶ و ۷۶/۴ قرار داشتند و در گروه کنترل ۳۹ زن و ۴۸ مرد به ترتیب با درصد ۴۴/۸ و ۵۵/۲ قرار داشتند. از نظر شدت درگیری بر اساس معیارهای Lund Mc kay در گروه بیمار دو نفر (۱/۹٪) نمره

جدول-۱: فراوانی آلل‌های CD14 در دو گروه بیمار و کنترل

آلل	فراوانی (%)	Valid percent	درصد تجمعی
گروه مورد*			
CC	۱۹(۱۷/۹)	۱۷/۹	۱۷/۹
CT	۵۶(۵۲/۸)	۵۲/۸	۷۰/۸
TT	۳۱(۲۹/۲)	۲۹/۲	۱۰۰
مجموع	۱۰۶(۱۰۰)	۱۰۰	
گروه شاهد			
CC	۱۵(۱۷/۲)	۱۷/۲	۱۷/۲
CT	۳۴(۳۹/۱)	۳۹/۱	۵۶/۳
TT	۳۸(۴۳/۷)	۴۳/۷	۹۴/۵
مجموع	۸۷(۱۰۰)	۱۰۰	۱۰۰

* CC+CT Vs. TT: $p = 0.0374$ Odds ratio: $1/8762$ & CI 95% (0/9910-3/5564)

این مطالعه به صورت یک بررسی مورد-شاهدی (Case-control) انجام شد. گروه شاهد افراد نرمال بودند که سابقه آلرژی آسم، رینیت آلرژیک، پولیپ یا سایر بیماری‌های بینی و سینوس نداشتند. این افراد ضمن تطابق سنی و جنسی از دانشجویان پزشکی یا افراد مراجعه کننده به درمانگاه به صورت داوطلبانه و با آگاهی از طرح انتخاب شدند. گروه بیمار شامل کلیه بیماران مبتلا به پولیپوز بینی مراجعه کننده به درمانگاه بیمارستان امیراعلم طی سال‌های ۸۸-۱۳۸۶ بوده‌اند. رضایت‌نامه کامل از بیماران و شرکت‌کنندگان داوطلب در طرح گرفته شده است. لازم به ذکر است کلیه هزینه‌های اضافی از قبیل هزینه آزمایش CD14 از طریق بودجه طرح تحقیقاتی پرداخت گردید و هزینه اضافی بر بیمار تحمیل نشد. از افراد مورد مطالعه نمونه خون کامل در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد که ابتدا DNA از گلبول‌های سفید خون استخراج و سپس تحت عمل PCR-RELP قرار گرفته و در نهایت نوع پلی مورفیسم ژنی مشخص شد.^۸ حجم نمونه بر اساس محاسبات آماری در هر کدام از گروه‌های شاهد و کنترل ۶۰ نفر تعیین شد. معیار ورود به مطالعه کلیه بیماران پولیپوز بینی مراجعه‌کننده به درمانگاه تخصصی بیمارستان امیراعلم بودند که براساس معیارهای سی‌تی‌اسکن نمره بالای ۱۲ Lund Mackay داشتند (ضمیمه ۱). معیارهای خروج از مطالعه نداشتن مراجعه مجدد و حداقل نمره توموگرافی کامپیوتری و عدم رضایت بیمار بود. آزمایشات مولکولی مورد نیاز، در آزمایشگاه ژنتیک مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. اطلاعات جمع‌آوری شده به رایانه منتقل شده و تحت بررسی و آنالیز قرار گرفته است. DNA طبق پروتکل استخراج DNA از خون کامل به روش نمک اشباع با کمک آنزیم پروتیناز K (کمپانی فرمتاس، آلمان) انجام و سپس کیفیت DNA استخراج شده، با دو روش الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی گردید. نمونه‌های ژنومیک DNA تحت عمل Polymerase Chain Reaction (PCR) با دستگاه Amplicon PCR master mix محصول دانمارک قرار گرفتند و سپس از محصولات آن با روش Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) به وسیله آنزیم MSPI شرکت Eppendorfe کشور آلمان طبق پروتکل مطالعه Esterbauer تعیین ژنوتیپ صورت گرفت (Esterbauer et al 2001).

جدول-۲: فراوانی آلل‌های CD14 در افراد آسمی و غیر آسمی

آلل	آسم دارد	آسم ندارد	مجموع
CC	۷	۹	۱۶
CT	۹	۴۰	۴۹
TT	۴	۲۴	۲۸
مجموع	۲۰	۷۳	۹۳

CC Vs. CT+TT: Odds ratio= ۳/۸۲۹۰ CI 95% (۰/۹۹۹۸-۱۳/۹۰۵۲)

جدول-۳: فراوانی آلل‌ها بر اساس معیارهای سی تی اسکن

کد	آلل	LMK*	مجموع
نوع آلل CD14	۳	۴	
CC	۰	۱۴	۱۴
CT	۲	۴۲	۴۴
TT	۰	۲۷	۲۷
مجموع	۲	۸۳	۸۵

CD14 * Lund Mc Kay : ۱۰-۱۴: ۳ ۱۵-۲۴: ۴

بحث

۱۰-۱۴ و ۸۳ نفر (۹۸/۱٪) نمره ۲۴-۱۵ داشتند. در آندوسکوپی تشخیص ۲۲ نفر (۲۰/۸٪) پولیپ تاتورینه تحتانی ۸۳ نفر (۷۸/۳٪) پولیپ تاتورینه میانی و یک نفر (۰/۹٪) پولیپ فقط در دهانه OMC داشت. ۲۰ نفر (۱۸/۹٪) مبتلا به آسم و ۸۶ نفر (۸۱/۱٪) مبتلا به آسم نبودند. تعیین سطح CD14 در گروه Case ۱۰۶ نفر و کنترل ۸۷ نفر انجام شد. در مقایسه بین CC+CT نسبت به TT با Odds Ratio معادل ۱/۸۷۶۲۳۴ و $p=۰/۰۳۷۴$ ارتباط معنی‌دار بوده و بین آلل C از ژن CD14 و پولیپوز بینی نیز ارتباط معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) وجود داشت. این یافته‌ها فرضیه ما را در این بررسی تایید می‌نماید. در بررسی ما رابطه معنی‌داری بین آلل C (CC) و آسم در مقابل (CT+TT) وجود دارد. بدین معنی که فراوانی آلل CC در آسمی‌ها ۳/۸ برابر بیشتر است. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین آلل خاصی از CD14 و شدت درگیری براساس معیارهای Lund Mackay در سی تی اسکن یافت نشد.

مدیاتورهایی مثل IL-8 و لیزوزیم و گیرنده لپوپلی ساکارید (CD_14) در ترشحات بینی دیده می‌شود که بسته به شدت بیماری میزان این مدیاتورها هم افزایش می‌یابد.^{۱۴} در مطالعه دانشگاه ماساریک جمهوری چک نتایج حاکی از آن بود که آلل C یک ریسک فاکتور برای فنوتیپ‌های آلرژیک در سطوح پایین مواجهه می‌باشد در حالی که T allele یک ریسک فاکتور در سطوح بالای مواجهه می‌باشد.^{۱۵} در بررسی دیگر ژنوتیپ TT ۱۱ برابر افزایش ریسک آسم را در مواجهه با سطح بالای آندوتوکسین در مقایسه با هموزیگوت-های آلل C نشان دادند.^{۱۶،۱۷} بر اساس مطالعه ما رابطه معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بین آلل C (CT+CC) از CD14 و پولیپوز بینی وجود دارد و گروه Case با احتمال بیش از ۱/۸ برابر شانس دارا بودن آلل C را نسبت به گروه کنترل دارند. در مقایسه آلل CC با آلل (TT+CT)، ارتباط معنی‌داری بین آلل C CD14 و آسم وجود دارد. در بیماران مبتلا به آسم و حساسیت به آسپرین با توجه به استعداد پولیپوز بینی، شاید ارزیابی آلل C CD14 احتمال ابتلا به پولیپوز را در آینده پیش‌بینی نماید. با انجام مطالعات بیشتر و چند مرکزی به‌منظر می‌رسد در آینده داروهای با تاثیر مستقیم بر رسپتور سلولی CD14 جایگزینی مناسب برای کورتون‌تراپی در درمان پولیپوز باشد.

ضمیمه-۱: معیار Lund Mackay با توجه به یافته‌های CT اسکن

درگیری سینوس‌های ماگزایلا، فرونتال، اتموئید قدامی، اتموئید خلفی، اسفنویید در هر نیمه از صورت بر اساس شدت درگیری یعنی عدم درگیری "درگیری ناکامل" و "درگیری کامل" به ترتیب امتیاز صفر، یک و دو خواهند گرفت، به‌جز کمپلکس استئوماتال که در صورت درگیری امتیاز دو و در صورت عدم درگیری امتیاز صفر تعلق می‌گیرد. مجموع امتیازات تمام سینوس‌ها با هم جمع می‌شود و حداکثر نمره در هر طرف ۱۲ و در مجموع ۲۴ می‌باشد.

Charles W. Cummings, M.D. Paul W. Flint, M.D et al-Cummings: Otolaryngology: Head & Neck Surgery 2005, Mosby

علیرغم این‌که علت بیماری پولیپوز به‌طور دقیق مشخص نیست ولی آلرژی همواره به‌عنوان از عوامل بالقوه این بیماری مطرح بوده است.^۱ CD14 در منطقه کروموزومی ۵q۳۱ واقع شده است و تحقیقات گسترده و متعدد ژنومی بر روی این منطقه نشان داده است که حاوی Variation‌های متعددی مرتبط با بیماری آسم می‌باشد^۹ و همچنین CD14 به‌عنوان عامل پاسخ‌دهنده بالقوه برای ویروس‌های Syncytial تنفسی نیز در نظر گرفته می‌شود.^{۱۰} در این مطالعه سعی شد تا اثر پلی مورفیسزم تک نوکلئیدی CD14 را بر روی بیماری پولیپوز و رابطه این پلی مورفیسزم با شدت بیماری مذکور مورد بررسی قرار گیرد. ارتباط پلی مورفیسزم ژن CD14 با آسم و اتوپیی و آلرژی با واسطه IgE در جمعیت‌های مختلف گزارش شده است.^{۱۱-۱۳} در اتوزینوفیلیا که همراه آسم و سایر بیماری‌های آلرژیک مثل پولیپوز بینی دیده می‌شود

References

1. Kennedy DW, Blger WE. Disease of the Sinuses Diagnosis and Treatment. Hamilton, London: B.C. Decker Inc; 2001.
2. Ferrero E, Hsieh CL, Francke U, Goyert SM. CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. *J Immunol* 1990;145(1):331-6.
3. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249(4975):1431-3.
4. Wright SD. CD14: a leukocyte membrane protein that functions in the response to endotoxin. *FASEB J* 1990;4:A1848.
5. Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufer A, Herz U, et al. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 2002;360(9331):465-6.
6. Nishimura S, Zaitsum M, Hara M, Yokota G, Watanabe M, Ueda Y, et al. A polymorphism in the promoter of the CD14 gene (CD14/-159) is associated with the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr* 2003;143(3):357-62.
7. Yoon HJ, Shin JH, Yang SH, Chae DW, Kim H, Lee DS, et al. Association of the CD14 gene -159C polymorphism with progression of IgA nephropathy. *J Med Genet* 2003;40(2):104-8.
8. Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000;67(5):1154-62.
9. Martinez FD. CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(3):221-5.
10. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000;1(5):398-401.
11. Bucková D, Hollá LI, Znojil V, Vasků A. Polymorphisms of the CD14 gene and atopic phenotypes in Czech patients with IgE-mediated allergy. *J Hum Genet* 2006;51(11):977-83.
12. Gao PS, Mao XQ, Baldini M, Roberts MH, Adra CN, Shirakawa T, et al. Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q31. *Clin Genet* 1999;56(2):164-5.
13. Leynaert B, Guilloud-Bataille M, Soussan D, Benessiano J, Guénéguou A, Pin I, et al. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(3):658-65.
14. Kang HJ, Choi YM, Chae SW, Woo JS, Hwang SJ, Lee HM. Polymorphism of the CD14 gene in perennial allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70(12):2081-5.
15. Martinez FD. CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(3):221-5.
16. Takeuchi F, Nakae N, Kobayashi N, Kuwata S, Murayama T, Kawasugi K, et al. Genetic contribution of the CD14 -159C/T dimorphism in the promoter region in Japanese RA. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26(2):337-9.
17. Van Cauwenberge P, Van Zele T, Bachert C. Chronic rhinosinusitis and nasal polyposis: the etiopathogenesis revealed? *Verh K Acad Geneesk Belg* 2008;70(5-6):305-22.

The CD14 gene Polymorphism in nasal polyposis

Received: May 29, 2010 Accepted: August 28, 2010

Abstract

Nasrin Yazdani MD.¹
Mahsa Mohammad Amoli PhD.²
Ali Mersaghian MD.^{1*}
Ali Bagheri Hagh MD.¹
Forug Sayyehpour MSc.³
Reza Fotuhi MD.¹

1- Otorhinolaryngology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Department of Endocrine and Metabolism research centre, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Department of Immunogenetic, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Background: CD₁₄ is known as a receptor for bacterial LPS (Lipopolysaccharides) and is followed by inflammatory reactions. This receptor on macrophage surface has a major role for recognition and clearance was happen without inflammatory reaction. Prolonged exposure to microbial products decreases the risk of allergic reactions. This is related to high level of CD₁₄ in blood cells. Although the causes of nasal polyposis is not obviously determined but allergy is a potential risk factor for nasal polyposis. CD₁₄ is in 5q31 chromosomal position and CD₁₄ variants have association with asthma. We try to assay association between CD₁₄ polymorphism and nasal polyposis and severity of this disease.

Methods: We had 106 patients with nasal polyps with mean age 41 y old in case group and 87 with mean age 36.7 in control group. We obtained 3 ml whole blood from each patient and then extract DNA by PCR-RFLP method and determined variant genotypes of CD₁₄. Although there is no previous study in this field, the results of this pilot study shown in more detailed below.

Results: There is significant relationship between C allele (CC + CT) in comparison with TT (p= 0.03, odds ratio= 1.87, CI 95% (0.99– 3.55)) and nasal polyposis. Furthermore another significant relationship had been shown between asthmatic patients and C allele (CC) in comparison with (CT + TT). (p= 0.01, odds ratio= 3.8, CI (0.99- 13.9). In asthmatic patients with C allele of CD₁₄ incidence of nasal polyposis increased.

Conclusion: Based on the results of this study, C allele of CD₁₄ could play a role in nasal polyposis.

Keywords: CD₁₄, polymorphism, polyposis, PCR.

* Corresponding author: Dept. of Otolaryngology, Amiralam Hospital, North Saadi Ave., Tehran, Iran
Tel: +98-21-66706106-9
email: mersaqianali@yahoo.com