Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وپنجم–شماره ۱۳۶
شهریور ۱۳۹۷

بررسی پلی مورفیسم ژن TNF-α (rs1800629) در بیماران مبتلا به آلوپسیا آره آتا

نویسندگان: لیلا خاکسار[۱]، پردیس سادات طباطبایی‌پناه[۱*]، رضا اکبر زاده[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی اروژنیتال، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان آموزشی شهید لبافی نژاد، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: پردیس‌سادات طباطبایی‌پناه **E-mail: tabatabaeipanah@gmail.com**

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۱۳
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۰۵/۲۷
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۵

چکیده

مقدمه و هدف: آلوپسیا آره آتا (AA) یک ریزش موی خودایمنی است که حدود ۱ تا ۲٪ از جمعیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگرچه سبب‌شناسی و پاتوژنز بیماری هنوز ناشناخته است اما پلی مورفیسم TNFα-308G/A به عنوان عامل مؤثر در گسترش AA شناخته شده است. هدف از انجام تحقیق، بررسی تأثیر این پلی مورفیسم بر بیماران مبتلا به AA و افراد کنترل است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه شامل ۳۰ بیمار مبتلا به AA و ۱۵ فرد کنترل است. DNA ژنومی توسط روش DNG-Plus جداسازی و توسط روش PCR-RFLP به منظور تشخیص پلی مورفیسم TNFα-308G/A انجام گرفت. به علاوه ارتباط این ژن‌ها با فاکتورهای دموگرافیک مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج تست PCR-RFLP مشخص کرد که ژنوتیپ GG بیشترین فراوانی را در افراد مبتلا به آلوپسیا آره آتا و افراد کنترل دارد (P= 0.816). ژنوتیپ GA در ۳۰٪ بیماران و ۲۰٪ افراد کنترل شناسایی گردید (P= 0.477). ژنوتیپ AA فقط در ۶/۷٪ افراد کنترل یافت شد اما هیچ‌کدام از بیماران دارای ژنوتیپ AA نبودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم TNFα-308G/A با بیماری AA و فاکتورهای دموگرافیک مورد بررسی وجود ندارد.

واژگان کلیدی: آلوپسیا آره آتا، بیماری خودایمنی، پلی مورفیسم، TNF-α، PCR-RFLP.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

مقدمه

آلوپسیا آره آتا (AA) یک بیماری درگیر کننده مو و گاه ناخن بوده و ممکن است به تنهایی یا همراه با اختلالات دیگر ایجاد شود (۱).AA یک اختلال نسبتاً رایج بوده و شیوع آن حدود یک هزارم است (۱). براساس مطالعات اپیدمیولوژیک، ۱٪ جمعیت تا سن ۵۰ سالگی AA پیدا می‌کنند (۱). این بیماری یکی از علل ریزش موی بدون اسکار عودکننده و گاهی مقاوم به درمان است که به طور بالینی با یک ریزش موی تکه‌تکه[1] در نواحی مودار مانند اسکالپ[2]، ریش، ابروها، مژه‌ها و سایر موهای بدن تظاهر می‌کند. این آلوپسیا از شایع‌ترین آلوپسیا های قابل‌برگشت است. ریزش تمام موهای اسکالپ را آلوپسیا توتالیس[3]، ریزش همه موهای بدن را آلوپسیا یونیورسالیس[4] و ریزش موی حاشیه‌ای[5] اسکالپ را افیازیس[6] می‌نامند (۱) در سال ۱۷۶۰ این عارضه شناسایی شده و در منابع علمی نام آن برده شد (۲). پلی مورفیسم‌های متعددی در ارتباط با AA وجود دارد که در بین آن‌ها، TNF-αو TNF-β به طور وسیع مورد بررسی قرار گرفته‌اند. پلی مورفیسم‌ها در ژن TNF-α به شدت با آسیب‌های خودایمنی/ التهابی مرتبط نشان داده شده‌اند. اولین پلی‌مورفیسم TNF-α که توصیف می‌شود، به صورت TNF-α-308 G/A است که در داخل ناحیه‌ی پروموتر ژن پیدا شد که با افزایش ایجاد و توسعه بیماری خودایمنی مرتبط است. تغییرات در سطوح TNF-α که منجر به ایجاد تغییرات در رشد نرمال فولیکول‌های مو می‌شود، زمانی توصیف شد که گالبریت[7] و پندی[8] ارتباط بین حضور TNF-α-308 G/A و توسعه AA را متوجه شدند (۳).

TNF-α یک فاکتور پلیوتروپ از خانواده سایتوکاین‌ها و یک سایتوکاین پیش التهابی قوی متعلق به شبکه پلی‌پپتیدی مرکب از چندین سایتوکاین و فاکتور رشد است که توسط کارس ول[9]، در سال ۱۹۷۵ به دنبال تزریق LPS شناسایی شد (٤). این فاکتور بیشتر به وسیله ماکروفاژهای فعال شده در پاسخ به عفونت‌ها، لیپوپلی ساکارید و سایر تولیدات باکتریایی و حتی در پاسخ به پیشروی تومورها رها می‌شود. در گذشته از نوع مکانیسم‌های پاسخ سلولی به مؤلفه‌های پاتوژن در تولید و فعال شدن اعضاء خانواده TNF-α این طور برداشت شده بود که TNF-α عاملی است که تولید آن تنها توسط اندوتوکسین باکتری‌ها القا می‌شود (۵)؛ اما امروزه کاملاً روشن شده است که این سایتوکاین‌ها اثرات گسترده و بسیار متنوعی روی انواعی از فرآیندهای زیستی سلول از جمله عملکردهای ایمنی، تکثیر، تمایز، مرگ سلولی، متابولیسم و آپوپتوز دارد (٦). بااین‌حال، تنظیم سلول‌های ایمنی و افزایش علائم التهاب، نقش اصلی TNF-α به حساب می‌آید (۷).

بسیاری از پزشکان عمومی به دلیل اینکه این عارضه تهدیدی برای ادامه حیات و زندگی به شمار نمی‌رود به آن بی‌اعتنا هستند. همچنین یکی از مزیت‌های مورد توجه در این بیماری نبود درد است اما این بیماری اثرات قابل توجه روحی و روانی عدیده‌ای بر روی افراد و کیفیت زندگی‌شان دارد (۸). با توجه به نبود اطلاعات کافی و جامع در مورد دلایل بروز AA در جمعیت ایرانی، ضرورت دارد در این مورد تحقیقات فراوانی صورت گیرد. در این پژوهش در جهت ارتباط پلی‌مورفیسم (rs1800629) ژن TNFα با بروز بیماری AA بررسی صورت گرفته و امکان مقایسه با جمعیت‌های دیگر جهان فراهم آمده است. هم‌چنین از این نتایج در جهت آنالیز بیش‌تر دلایل بروز این بیماری و اهداف درمانی آینده می‌توان استفاده کرد.

1. Patchy
2. Scalp
3. Alopecia totalis
4. Alopecia Universalis
5. Band like
6. Ophiasis
7. Galbarith
8. Pandey
9. Carswell

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه

در این پژوهش که از نوع توصیفی بود ۳۰ نمونه از افراد مبتلا به آلوپسیا آره آتا (AA) و ۱۵ فرد کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. افراد مورد مطالعه از میان مراجعه‌کنندگان به بخش پوست بیمارستان شهدای تجریش و لقمان حکیم انتخاب شدند که از مردادماه ۹۳ تا آبان ماه ۹٤ به این بیمارستان‌ها مراجعه کرده بودند. نمونه‌گیری پس از کسب رضایت‌نامه از بیماران و افراد کنترل زیر نظر کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و تحت معیار سازمان بهداشت جهانی(W.H.O)[1] انجام گرفت. در ضمن نمونه‌گیری از از افراد، پرسش‌نامه‌های تدوین شده نیز توسط این افراد تکمیل شد. سؤالات پرسش‌نامه براساس ارتباط این بیماری با فاکتورهای مهم دخیل در ایجاد آن طرح شده و جهت جمع‌آوری این اطلاعات از مقالات معتبر (۸) استفاده شد.

جمع‌آوری خون و استخراج DNA از خون محیطی

نمونه‌های خون در فالکون‌های حاوی 1mg/ml EDTA جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در دمای ۲۰°c- تا زمان استخراج کامل نگهداری شدند. سپس استخراج DNA از خون کامل با کیت DNG-Plus شرکت سیناژن انجام شد.

انجام واکنش PCR تکنیک PCR-RFLP

ابتدا برای ٤٥ نمونه بیمار و کنترل و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Forward و Reverse که از مقالات معتبر (۹) استخراج و صحت آن‌ها توسط سایت بیوانفورماتیکی NCBI تأیید شده بود (جدول ۱) واکنش PCR انجام شد. دستگاه اسپکتروفوتومتر، هنگام قرائت OD الگوی DNA، غلظت آن را هم محاسبه می‌کند. بر اساس غلظت نمونه‌های DNA و با توجه به اینکه نیاز به DNA 300 ng /µl در واکنش PCR بود، حجم DNA template تمام نمونه‌های بیمار و کنترل محاسبه شد. شرایط PCR برای TNF-α به شرح زیر بود: ۵ دقیقه در°c ۹۵ و سپس ۳۵ سیکل برای ۲۰ ثانیه در°c ۹۵، ۲۰ ثانیه در°c ۵۸ و ٤۰ ثانیه در°c ۷۲ و سپس یک سیکل برای ۷ دقیقه در°c ۷۲ دنبال شد. واکنش PCR برای نمونه‌ها با کنترل‌های منفی کافی انجام شد. هم‌چنین اختصاصیت واکنش توسط الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

انجام واکنش RFLP

در این مرحله برای محصولات PCR شده، با استفاده از بافر Tango 10X و آنزیم NcoI واکنش RFLP انجام شد. شرایط RFLP برای TNF-α به شرح زیر بود: ١٦ ساعت در°c ۳۷ جهت انکوباسیون و ۲۰ دقیقه در°c ٦٥ جهت غیر فعال کردن آنزیم دنبال شد. لازم به توضیح است که برای بدست آوردن این دماها و زمان‌های بهینه، چندین بار آزمایش انجام شد. ضمناً یک نمونه DNA دار اما بدون آنزیم محدودکننده به عنوان کنترل منفی قرار داده شد تا از صحت نتیجه اطمینان حاصل شود.

ارزیابی آماری

آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. نتایج متغیرهای کمی به شکل میانگین±انحراف معیار و نتایج متغیرهای کیفی به شکل تعداد و فراوانی عنوان گردید. برای مشخص کردن توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف استفاده گردید. برای بررسی متغیرهایی که توزیع نرمال داشتند از آزمون آماری Independent Sample T-test و One way Anova و برای آنالیز متغیرهایی که توزیع غیر نرمال داشتند از آزمون آماری۲ Independent Sample test و k-Independent Sample test استفاده شده است. تمام این اطلاعات اندازه‌گیری شده در جدول دموگرافیک بیان شد. از آزمون لوجستیک رگرسیون برای اندازه‌گیری نسبت شانس (OR) و ضریب اطمینان ۹۵٪ (۹۵٪ CI) به منظور بررسی فاکتورهای خطر استفاده شد. همه مقادیر P ودمه بودند و CI ها در ۹۵٪ تنظیم گردید. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

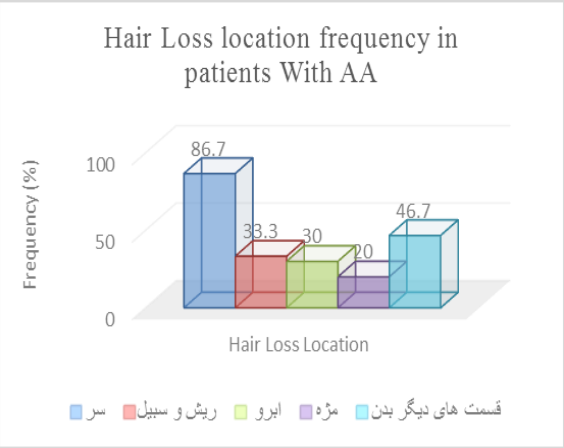
[1]. World Health Organization

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

یافته‌ها

خصوصیات آماری

در این مطالعه که به روش هم‌گروهی تاریخی انجام شد، ۳۰ بیمار مراجعه‌کننده به بیمارستان شهدای تجریش تهران و ۱۵ فرد کنترل مطالعه گردید. اطلاعات آماری در جدول ۲ نشان داده شده است. در این میان عواملی همانند سابقه ابتلا به عفونت‌های ویروسی (P value= 0.01)، داشتن استرس در زندگی (P value= 0.01) و داشتن سابقه جراحی (P value= 0.05) با وقوع بیماری با سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵، معنی‌دار بودند که در جدول ۲ به طور کامل ذکر شده‌اند. هم‌چنین مشخص شد که ابتلا به AA در سنین ۲۶ تا ۳۵ سال نسبت به بقیه سنین با فراوانی ۴۳/۳٪ بیشترین مقدار را داشته است (شکل ۱).



شکل ۱. فراوانی مناطق ریزش در بیماران مبتلا به AA

بررسی پلی مورفیسم TNFα-308G/A به روش PCR-RFLP

پل مورفیسم rs1800629 در ژن TNF-α توسط PCR-RFLP بر روی نمونه‌های مربوط به بیماران مبتلا به AA و افراد کنترل بررسی شد. نتایج PCR-RFLP نشان می‌دهد که از ۳۰ نمونه بیمار مبتلا به آلوپسیا آره آتا، ۲۱ مورد با فراوانی ۷۰٪ و از ۱۵ نمونه‌ی کنترل، ۱۱ مورد با فراوانی ۷۳/۳٪، دارای ژنوتیپ GG(P= 0.816, OR= 1.179, 95% CI= 0.295-4.71) و ۹ مورد با فراوانی ۳۰٪ در بین بیماران و ۳ مورد با فراوانی ۲۰٪ در بین نمونه‌های کنترل دارای پلی مورفیسم AG (P= 0.477, 0R= 0.583, 95% CI= 0.132-2.58) بودند و پلی مورفیسم AA تنها در یک مورد از نمونه‌های کنترل با فراوانی ۶/۷٪ (P= 1.00, OR= 346173, 95% CI= 0.00) مشاهده شد و در بین نمونه‌های بیمار هیچ موردی با پلی‌مورفیسم AA مشاهده نشد. با توجه به مقادیر به‌دست‌آمده، بین انواع پلی مورفیسم‌های TNF-α (AA, AG, GG) و بیماری آلوپسیا آره آتا از نظر آماری، با سطح معناداری بالاتر از ۰/۰۵، رابطه‌ی معنی‌داری وجود ندارد. همچنین الل G با فراوانی ۸۵٪ در بیماران و فراوانی ۸۳/۳٪ در نمونه‌های کنترل (P= 1.00, OR= 0.00, 95% CI= 0.00) و الل A با فراوانی ۱۵٪ در بین بیماران و فراوانی ۱۶/۶٪ در نمونه‌های کنترل (P= 0.816, OR= 0.848, 95% CI= 0.212-3.391) مشاهده شدند.

با توجه به مقادیر به‌دست‌آمده و با سطح معناداری بالاتر از ۰/۰۵ از نظر آماری، بین این الل‌ها به عنوان محل ایجاد SNP و بیماری آلوپسیا آره آتا رابطه‌ی معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۳). هم‌چنین ارتباط اطلاعات دموگرافیک در بیماران مبتلا به AA و افراد کنترل در مقایسه با وجود و یا عدم وجود پلی مورفیسم با آزمون‌های آماری نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ مورد بررسی قرار گرفت که این نتایج نشان داد هیچ‌کدام از اطلاعات دموگرافیک مورد بررسی با پلی‌مورفیسم ژن TNF-α دارای ارتباط معنی‌داری نمی‌باشند و ارتباط بین اطلاعات دموگرافیک با ژنوتیپ‌های GG و AG در بیماران مبتلا به آلوپسیا آره آتا نیز با این نرم‌افزار بررسی شد؛ اما ارتباط معنی‌داری بین آن‌ها نیز مشاهده نشد (جدول ۵).

بررسی توزیع ژنوتیپی بیماران مبتلا به AA و افراد کنترل در سه مدل توارثی مختلف (Additive، Dominant و Recesive)

این بررسی با آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ مشخص کرد که P Value در Additive، Dominant و Recesive معنی‌دار نیست (جدول ٤).

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

جدول ۱. واریانت، آنزیم محدودکننده و پرایمرهای ژن TNF-α برای آزمون PCR-RFLP

Gene name	TNF-α
variation	rs1800629–308 G/A
forward	5´- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT -3′
reverse	5´- CCTCCCTGCTCCGATTCCG -3′
Restriction enzyme	*NcoI*

جدول ۲. اطلاعات دموگرافیک بیماران مبتلا به AA و افراد کنترل

خصوصیت		گروه بیمار	گروه کنترل	P value
جنس (٪) n	زن	۱۳(۴۳/۳)	۵ (۳۳/۳)	—
	مرد	۱۷(۵۶/۷)	۱۰ (۶۶/۷)	
سن (سال) (میانگین ± انحراف معیار)		۲۶/۳۳± ۱۲/۴۴	۳۰/۱۳± ۵/۸	۰/۲۶
مدت‌زمان ابتلا (سال)(میانگین ± انحراف معیار)		۵/۰۵ ± ۴/۷۶	—	۰/۹۷
سن شروع ابتلا (سال)(میانگین ± انحراف معیار)		۲۱/۱۶± ۱۳/۶۸	—	۰/۹۸
وجود سابقه خانوادگی (٪) n		۶ (۲۰)	۱ (۶/۷)	۰/۲۶۸
سابقه ابتلا به عفونت موضعی (٪) n		۱ (۳/۳)	۶ (۴۰)	۰/۰۱
وجود مشکلات ناخن (٪) n		۹ (۳۰)	—	—
دارا بودن استرس (٪) n		۲۳(۷۶/۷)	۶ (۴۰)	۰/۰۱
ابتلا به افسردگی مزمن (٪) n		۶ (۲۰)	۱ (۶/۷)	۰/۲۶۸
ابتلا کم‌خونی (٪) n		۹ (۳۰)	۲ (۱۳/۳)	۰/۲۳
ابتلا به کم‌کاری تیروئید (٪) n		۴ (۱۳/۳)	۰	—
ابتلا به بیماری‌های کبدی (٪) n		۷ (۲۳/۳)	۰	—
سابقه جراحی (٪) n		۱۳ (۴۳/۳)	۲ (۱۳/۳)	۰/۰۵۸
سابقه اگزمای پوستی (٪) n		۴ (۱۳/۳)	۱ (۶/۷)	۰/۵۱
کاهش شدید وزن (٪) n		۲ (۶/۷)	۲ (۱۳/۳)	۰/۴۶
افزایش شدید وزن (٪) n		۲ (۶/۷)	۰	—
در معرض آفتاب شدید بودن (٪) n		۱۰ (۳۳/۳)	۳ (۲۰)	۰/۳۵
سابقه تغییرات هورمونی (٪) n		۳ (۱۰)	۱ (۶/۷)	۰/۷۱
تجربه ترس شدید (٪) n		۱۴ (۴۶/۷)	۶ (۴۰)	۰/۶۷
شدت بیماری n (٪)	کمتر از ۵۰ درصد	۱۵ (۵۰)		
	بیشتر از ۵۰ درصد	۱۵ (۵۰)		
محل ریزش مو n (٪)	سر	۲۶ (۸۶/۷)		
	ریش و سبیل	۱۰ (۳۳/۳)		
	ابرو	۹ (۳۰)		
	مژه	۶ (۲۰)		

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

جدول ۳. فراوانی اللی و توزیع ژنوتیپ TNF-α در جمعیت بیمار مبتلا به آلوپسیا آره آتا و کنترل

ژن	ژنوتیپ / الل		بیماران AA n(%)	کنترل‌ها n(%)	OR	95% CI	P Value
TNF-α	ژنوتیپ	GG	21 (70)	11 (73.3)	0.848	0.212-3.391	> 0.05
		AG	9 (30)	3 (20)	1.714	0.388-7.582	
		AA	0	1 (6.7)	0	0	
		Total	30 (100)	15 (100)	—	—	
	الل	G	51 (85)	25 (83.3)	3461735166	0	> 0.05
		A	9 (15)	5 (16.6)	1.179	0.295-4.710	
	P Value < 0.05: Significant معنی‌دار *P Value* > 0.05: non Significant بی‌معنی						

جدول٤. آنالیز لوجستیک رگرسیون افراد مبتلا به AA در مقابل افراد سالم در ۳ مدل توارثی مختلف

Genetic models		*P value*	OR	95% CI
Additive	**GG=0, AG=1, AA=2**	**0.836**	**1.136**	**0.341-3.784**
Dominant	**GG & AG vs. AA**	**1.00**	**0**	**0**
Recessive	**AA & AG vs. GG**	**0.554**	**1.571**	**0.352-7.018**

جدول ۵.آنالیز لوجستیک رگرسیون ارتباط اطلاعات دموگرافیک با انواع ژنوتیپ های TNF-α در بیماران مبتلا به آلوپسیا آره آتا

P Value		95% CI		OR		اطلاعات دموگرافیک	
GG	AG	GG	AG	GG	AG		
0.101	0.101	0.763-20.963	0.048-1.31	4	0.25	جنسیت	
0.203	0.203	0.892-1.025	0.976-1.121	0.956	1.046	سن	
0.147	0.147	0.89-1.01	0.983-1.124	0.952	1.051	سن شروع ابتلا (سال)	
0.379	0.379	0.915-1.265	0.791-1.093	1.07	0.930	مدت‌زمان ابتلا به بیماری (سال)	
0.437	0.437	0.248-25.15	0.04-4.02	2.5	0.4	سابقه خانوادگی	
0.546	0.546	0.285-10.74	0.093-3.5	1.75	0.571	مشکلات ناخن	
0.402	0.402	0.365-12.38	0.081-2.743	2.125	0.471	داشتن استرس	
0.842	0.842	1.22-5.573	0.179-8.217	0.824	1.214	ابتلا به افسردگی	
0.166	0.166	0.515-47.07	0.021-1.94	4.923	0.203	ابتلا به کم خونی	
0.138	0.318	0.326-31.42	0.032-3.068	3.2	0.313	ابتلا به بیماری های کبدی	
0.936	0.936	0.194-4.522	0.221-5.14	0.938	1.067	داشتن سابقه جراحی	
1.00	1.00	0.191-5.24	0.191-5.241	1.00	1.00	قرار گیری در معرض تابش شدید آفتاب	
0.343	0.343	0.431-11.21	0.089-2.318	2.2	0.455	تجربه ترس شدید	
0.691	0.691	0.151-3.493	0.286-6.6	0.727	1.375	شدت بیماری	
0.9	0.9	0.00	0.00	0.00	0.00	سر	محل ریزش
1.00	1.00	0.191-5.241	0.191-5.241	1.00	1.00	ریش و سبیل	
0.265	0.265	0.489-13.38	0.075-2.04	2.56	0.391	ابرو	
0.842	0.842	0.179-8.217	0.122-5.57	1.21	0.824	مژه	

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

بحث

بررسی در مورد این بیماری دارای محدودیت‌هایی است. اکثریت این بیماران از بیماری خودآگاهی کامل نداشته و به مراکز درمانی مراجعه نکرده و با خوددرمانی سعی در بهبود علائم بیماری دارند. آن‌هایی هم که به مراکز درمانی مراجعه می‌کنند به دلیل ظاهر خود تمایل چندانی به همکاری با برنامه‌های پژوهشی ندارند بنابراین این مسائل نمونه‌گیری را با مشکل مواجه می‌کند. یافته‌های مهمی که در مطالعه حاضر به دست آمد به این شرح است: اول‌ازهمه، در آنالیز آماری اطلاعات دموگرافیک افراد بیمار مبتلا به AA و افراد کنترل مشخص شد که داشتن سابقه جراحی، سابقه عفونت و استرس در زندگی با ابتلا به بیماری AA در ارتباط است. هم‌چنین در بیماران مبتلا به AA، سر نسبت به بقیه مناطق بدن، بیشترین ریزش مو را داشته است. پایین‌ترین سن ابتلا به آلوپسیا آره آتا در بین مراجعه‌کنندگان ۲ سال و ۹ ماه و بالاترین سن ابتلا ٥٤ سال بود و میانگین سن ابتلا به آلوپسیا آره آتا در بین بیماران مورد مطالعه ۱۷/۵ سال محاسبه گردید و مشخص شد که برخلاف بسیاری از بیماری‌ها که با افزایش سن، فراوانی ابتلا بیشتر می‌شود اما در بیماری AA، این مسئله صادق نیست و ابتلا به این بیماری در سنین ٢٦ تا ۳۵ سال نسبت به بقیه سنین فراوانی بیشتری دارد. دوم اینکه، بررسی‌های آماری نشان داد که هیچ‌کدام از اطلاعات دموگرافیک مورد بررسی با پلی مورفیسم ژن TNF-α نیز در ارتباط نیستند. سوم، فراوانی ژنوتیپ GG که ژنوتیپ بدون پلی مورفیسم است، در بیماران مبتلا به آلوپسیا آره آتا و افراد کنترل نسبت به ژنوتیپ های GA و AA بیش‌تر است و در نتیجه اکثر نمونه‌های مورد بررسی در واریانت rs1800629 ژن TNF-α، دچار جهش نشده‌اند. چهارم، فراوانی الل G در بیماران مبتلا به آلوپسیا آره آتا و افراد کنترل، نسبت به الل A بسیار بیش‌تر است و چون نوکلئوتید G محل ایجاد SNP است، پس فراوانی الل جهش نیافته (G) نسبت به الل جهش‌یافته (A) در جمعیت مورد بررسی بیش‌تر است؛ و پنجم اینکه، در بررسی توزیع ژنوتیپی بیماران مبتلا به AA و افراد کنترل در مدل‌های توارثی Additive، Dominant و Recesive مشخص شد که هیچ‌کدام از این مدل‌ها ارتباط معناداری با بیماری آلوپسیا آره آتا ندارند. هم‌چنین در بررسی توزیع جمعیتی rs1800629 ژن TNF-α مشخص شد که نوکلئوتید جهش‌یافته (A)، در کل دنیا به میزان ۹٪ است.

پلی‌مورفیسم TNFα-308 G/A در چندین بیماری گزارش شده است. تحقیقی که در جمعیت مکزیک انجام شد، ارتباط بین این پلی مورفیسم و پاتولوژی بیماری‌هایی مثل روماتیسم قلبی[1]، کولیت اولسراتیو[2]، اسپاندیلوآرتریت[3] و لوپوس اریتماتوس لوپوس[4] و همچنین استعداد ژنتیکی ابتلا به بیماری شاگاس[5] و خطر تنگی مجدد عروق کرونر[6] پس از قرار دادن استنت[7] را شرح داده است؛ زیرا ژن TNF-α یکی از قوی‌ترین سایتوکاین های پیش التهابی قوی را کد می‌کند، هم‌چنین به عنوان یک تعدیل‌کننده ایمنی عمل می‌کند، این ژن به منزله یک کاندید مهم در تعیین استعداد ژنتیکی توسعه AA به کار می‌رود، به همین دلیل مطرح شده است که این بیماری دارای ویژگی‌های مشترک با بیماری‌های خودایمنی است. ارتباط AA با دیگر بیماری‌های خودایمنی/ التهابی، حضور لنفوسیت‌های TCD4 در اطراف فولیکول مو، حضور گردش آنتی‌بادی‌های خودی در مقابل اجزای فولیکول مو و مهم‌تر، پاسخ به سرکوب‌کننده های سیستم ایمنی و درمان تعدیل‌کننده ایمنی به این نظریه اضافه می‌شوند (۲). بیماری AA هر دو گروه مردها و زن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند، اگرچه به نظر می‌رسد که مردها با موارد شدید آلوپسیا آره آتا نسبت به زن‌ها بیش‌تر در ارتباط هستند (۱۰). آسیب‌های

1. Rheumatic heart
2. Ulcerative colitis
3. Spondyloarthritis
4. Systemic lupus erythematosus
5. Chagas
6. Coronary
7. Stent

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

روحی اغلب به عنوان یک فاکتور مهم در ایجاد حملات AA و یا در پیشرفت بیماری، مطرح شده است (۸).

در مطالعه مریم اخیانی و همکارانش در سال ۲۰۱۰، در مورد ارتباط بین شدت AA و اطلاعات دموگرافیک آن در ۲۳۹ بیمار مبتلا به AA(۱٤۱ مرد و ۹۵ زن) مشخص شد که (۸۸/۷٪)۲۱۲ بیماران اولین رخداد بیماری را قبل از سن ٤۰ سالگی داشتند. طول مدت بیماری از یک ماه تا ۳۱ سال متغیر بود. (٤۰/۲٪)۹٦ بیماران تجربه تنها یک رخداد و (۱۰/۵٪)۲۵ بیماران تجربه‌ی بیش از ٤ رخداد AA را داشتند. تغییرات ناخنی در (۱٤/۲٪)۳٤ بیماران گزارش شد. (۱۸/۸٪)٤۵ بیماران دارای سابقه‌ی خانوادگی مثبت برای AA بودند. سابقه‌ی آتوپی و بیماری‌های خودایمنی به ترتیب در (۹/٦٪)۲۳ و (۱۱/۳٪)۲۷ بیماران دیده شد. ارتباط بین شدت AA با سن شروع، طول دوره‌ی بیماری، تغییرات ناخنی و سابقه‌ی خانوادگی مثبت با P کمتر از ۰/۰۵ تأیید شد و بین شدت AA با جنس، بازگشت بیماری، آتوپی و بیماری‌های خودایمنی دیگر با P بیشتر از ۰/۰۵ ارتباطی وجود نداشت (۱۱).

در مطالعه هلن کمپ[1] و همکارانش در سال ۲۰۰٦، بر روی ۱۹۳ بیمار مبتلا به AA (٦۰ مرد و ۱۳۳ زن) با میانگین سنی ٤۲ سال و ۵۰۷ فرد کنترل و سالم (۲٤٤ مرد و ۲٦۳ زن) با میانگین سنی ٤۱ سال در جمعیت انگلیس، ۱۰۷ نفر به AA خفیف و ۸٤ نفر به AA شدید مبتلا بودند و ۱۱۳ نفر از مبتلایان در بررسی‌های آن‌ها سن شروع بیماری زیر ۲۰ سال و ۸۳ نفر سن بالای ۲۰ سال داشتند (۱۲).

گیلیان[2] و همکارانش در سال ۱۹۹۵، به بررسی پلی مورفیسم ژن TNF-α در بیماری AA روی ۵۰ بیمار مبتلا به AA پرداختند. توزیع فنوتیپ‌های TNF-α T1,T2 بین بیماران با فرم تکه‌ای بیماری و بیماران با بیماری توتالیس و یونیورسالیس متفاوت بود و ارتباط معنی‌داری در توزیع فنوتیپ‌های TNF-α, G/A بین گروه‌های بیمار وجود نداشت. در جمعیت کنترل، فراوانی پلی مورفیسم الل 238- و 308- با گزارش‌های قبلی مشابه بود. تفاوت قابل‌توجهی در توزیع فنوتیپ‌های پلی مورفیسم 308- بین بیماران با AA تکه‌ای وقتی‌که با فرم توتالیس/ یونیورسالیس بیماری مقایسه می‌شوند (P=0.003) وجود داشت. در توزیع فنوتیپ بین بیماران با AA تکه‌ای و کنترل‌ها هم‌چنین تفاوت مشاهده شد (P= 0.09)؛ اما تفاوت قابل‌توجهی در فراوانی فنوتیپ‌ها بین بیماران توتالیس و یونیورسالیس با کنترل‌ها وجود نداشت و بین هیچ‌کدام از فنوتیپ‌های TNF-α و حضور آنتی‌بادی‌های خودایمنی در جمعیت بیماران ارتباطی وجود نداشت (۱۳).

کانتا-سالیناس کریستینا[3] و همکارانش در سال ۲۰۱۲، به بررسی و مطالعه‌ی پلی‌مورفیسم پروموتر TNF-α-308 G/A در بیماران مکزیک با آلوپسیا آره آتا در ۵۹ بیمار با AA تکه‌ای و ۱۰۳ مورد بدون AA به عنوان گروه کنترل با روش PCR-RFLP پرداختند. وقتی الل TNF-α-308 G/A(TNF2) (P=0.026, OR= 3.22, 95%CI= 0.99-11.61) به طور مجزا در ژنوتیپ هتروزیگوت (TNF1/TNF2) (P= 0.023, OR= 3.53, 95%CI= 1.01-12.89) بررسی می‌شود خطر قابل‌توجهی برای گسترش AA ایجاد می‌کند در مقایسه با ژنوتیپ (TNF1/TNF1) که در کنترل‌ها مشاهده می‌شود (P= 0.023, OR= 0.28, 95%CI= 0.08-0.99). مطالعات آن‌ها پیشنهاد می‌کند که یک ارتباط محتمل بین حضور پلی مورفیسم TNF-α-308 G/A و استعداد بیش‌تر برای گسترش AA تکه‌ای وجود دارد. این خطر ممکن است ناشی از تولید بیش‌ازحد TNF-α باشد که پاسخ‌های خودایمنی در برابر فولیکول مو را تسهیل می‌کند (۳).

آفاد السايد[4] و همکارانش در سال ۲۰۱۲، پلی‌مورفیسم ژن‌های TNF-α-308 و INF-γ+847 را در ارتباط با حساسیت و شدت دیابت ملیتوس نوع ۲ در جمعیت مصر مطالعه کردند. مطالعه‌ی آن‌ها روی ۲۰۷

[1]. Helen kemp
[2]. Gillian
[3]. Cantu-salinas cristina
[4]. Afad Elsaid

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

بیمار دیابتی (۹۳ مرد و ۱۱٤ زن) با رنج سنی ٤۰ تا ۷۸ سال انجام شد و جهت تشخیص پلی مورفیسم هر دو ژن از روشARMS-PCR[1] استفاده کردند. نتایج آزمایش‌های آن‌ها نشان داد که ژنوتیپ AA هر دو ژن با فرکانس بالاتری در میان بیماران دیابتی وجود دارد وقتی با کنترل‌ها مقایسه می‌شوند. ۵/۸٪ در مقابل ۰/۹٪ و ۱۳٪ در مقابل ٦٪، اما از نظر آماری بی‌اهمیت است (P>0.05). ژنوتیپGG با فراوانی (۱٤/۵٪)۱۰ در بیماران نسبت به گروه کنترل (۱۰/٤٪)۱۱ (P= 0.478, OR= 1.46, 95%CI= 0.59-3.66). ژنوتیپ GA با فراوانی (۷۹/۷٪)۵۵ در بیماران نسبت به گروه کنترل (۸۸/۷٪)۹٤ (P= 0.129, OR= 0.5, 95%CI= 0.22-1.16). ژنوتیپ AA با فراوانی (۵/۸٪)٤ در بیماران نسبت به گروه کنترل (۰/۹٪)۱ (P= 0.08, OR= 6.46, 95%CI= 0.71-59.08) که هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌ها از نظر آماری دارای ارتباط معنی‌داری با این بیماری نیستند. فراوانی الل‌ها در TNF-α-308 به این صورت است: الل G با فراوانی (٥٤/۳٪)۷۵ در بیماران نسبت به گروه کنترل (٥٤/۷٪)۱۱٦ (P= 1.0, OR= 0.99, 95%CI= 0.64-1.52). الل A با فراوانی (٤٥/۷٪)٦۳ در بیماران نسبت به گروه کنترل (٤٥/۳٪)۹٦ (P= 1.0, OR= 1.02, 95%CI= 0.66-1.56) که هیچ‌کدام از الل‌ها نیز دارای ارتباط معنی‌داری با این بیماری نیستند (۱٤).

نتیجه‌گیری

این مشاهدات به ویژه نشان‌دهنده این حقیقت است که این سایتوکاین پیش التهابی در رخداد آلوپسیا آره آتا تأثیری نداشته است. هم‌چنین اکثر نمونه‌های مورد بررسی در واریانت rs1800629 ژن TNF-α دچار جهش نشده‌اند. با توجه به اینکه عوامل مختلفی هم چون سابقه جراحی، سابقه عفونت و استرس می‌تواند در ابتلا به این بیماری مؤثر باشد، تغییر و اصلاح روش زندگی می‌تواند در پیش‌گیری و درمان بیماری مؤثر باشد.

[1]. Amplification Refractory Mutation System

منابع

1. Alkhalifah A, Alsantali A, Wang E, McElwee KJ, Shapiro J. Alopecia areata update: part I. Clinical picture, histopathology, and pathogenesis. The Journal of American Academy of Dermatology 2010 62:177–188.
2. Thomas EA, Kadyan RS. Alopecia areata and autoimmunity: a clinical study. Indian Journal of Dermatology 2008;53:70–74.
3. Cristina CS, Mauricio SS, Armando LR, Celia SD, Clara RI, Rocío OL, Oliverio W, Jorge OC. Tumor necrosis factor alpha promoter-308G/A polymorphism in Mexican patients with patchy alopecia areata. International Journal of Dermatology 2012;51:571–575.
4. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1975;72:3666–3670.
5. Wallach D, Kovalenko A. 12th international TNF conference: the good, the bad and the scientists. Cytokine Growth Factor Reveiw 2009;20:259–269.
6. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature 1986 17;320:584–588.
7. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differentiation 2003;10:45–65.
8. Hunt N, McHale S. The psychological impact of alopecia. British Medical Journal 2005 22;331:951–953.
9. Ghaderian SMH, Akbarzadeh Najar R, Tabatabaei Panah AS. Tumor necrosis factor-α: investigation of gene polymorphism and regulation of TACE-TNF-α system in patients with acute myocardial infarction. Molecular Biology Reports 2011;38:4971–4977.
10. Islam N, Leung PSC, Huntley AC, Gershwin ME. The autoimmune basis of alopecia areata: a comprehensive review. Autoimmunity Review 2015;14:81–89.
11. Maryam A, Hasan S, Zahra H, Pardis K, Sara SR, Hosein AM. Correlation between the severity of alopecia areata and its risk factors. Iran Journal of Dermatology 2011;14:6–11.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

12. Kemp EH, McDonagh AJG, Wengraf DA, Messenger AG, Gawkrodger DJ, Cork MJ, Tazi-Ahnini R. The non-synonymous C1858T substitution in the PTPN22 gene is associated with susceptibility to the severe forms of alopecia areata. Human Immunology 2006;67:535–539.
13. Galbraith GM, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene polymorphism in alopecia areata. Human Genetics 1995;96:433–436.
14. Elsaid A, Helaly MA, Hatata E-SZ, Fouda O, Settin A. TNF-α-308 and INF-γ+874 Gene Polymorphisms in Relation to Susceptibility and Severity of Type 2 Diabetes Mellitus Elsaid A, Helaly MA, among Egyptian Cases. Electronic Journal of General Medicine 2012 10;9:173–177.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 21:48 IRST on Tuesday January 22nd 2019

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
25th Year, No.136
August-September 2018

Daneshvar(medicine) shahed University/ 25th year/2018 /NO.136

Received: 03/06/2018
Last revised: 18/08/2018
Accepted: 27/08/2018

Investigation of TNF-α(rs1800629) in patients with Alopecia Areata

Leila Khaksar[1], Pardis Sadat Tabatabaei Panah[1*], Reza Akbarzadeh[2]

1. Department of Biology, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran.
2. Urogenital Stem Cell Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Shahid Labbafi Nejad educational hospital, Tehran, Iran.

*** Corresponding author e-mail: tabatabaeipanah@gmail.com**

Abstract

Background and Objective: Alopecia Areata (AA) is characterized by an autoimmune hair loss usually, but not limited to, the scalp, affecting approximately 1-2% of the general population. Although the etiology and pathogenesis of this disease is still unknown, it is known that TNFα-308G/A polymorphism can influence the development of AA. The aim of this study was to investigate TNF-α(rs1800629) in patients with Alopecia Areata.

Materials and Methods: This study included 30 AA patients and 15 healthy subjects. Genomic DNA was isolated using DNG plus method and DNA was amplified by PCR-RFLP to detect TNFα-308G/A polymorphism. Furthermore, association of this TNFα-308G/A with demographic factors was assessed.

Results: PCR-RFLP results showed that GG was the most frequent genotype in both patient and control groups (P= 0.816). GA genotype was detected in 30% and 20% of patients and controls, respectively (P= 0.477). Genotype AA was detected in 6.7% of controls.

Conclusion: The results of TNFα-308G/A polymorphism showed no significant difference with respect to AA disease and demographic factors (p>0.05).

Keywords: Alopecia Areata, Autoimmune disease, Polymorphism, TNF-α, PCR-RFLP