

# بررسی جهش در اگزون ۱۰ ژن COL17A1 در بیماران مبتلا به بولوس پمفیگوئید

نویسندگان: صدیقه حاج منوچهری<sup>۱</sup>، پردیس سادات طباطبائی پناه<sup>۱\*</sup>، رضا اکبرزاده<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تهران شرق، تهران، ایران  
۲. مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی اروژنتال، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان آموزشی شهید لبافی نژاد، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: پردیس سادات طباطبائی پناه E-mail: tabatabaeipanah@gmail.com

## چکیده

مقدمه و هدف: بولوس پمفیگوئید (BP) متعلق به گروه بیماری‌های خودایمنی بوده و شایع‌ترین نوع در میان بیماری‌های پوستی همراه با تاول است. اگرچه مختصات ژنتیکی این بیماری هنوز به طور کامل روشن نشده است، برخی مطالعات ارتباط وجود یک پلی مورفیسم در اگزون ۱۰ ژن COL17A1 Exon (rs805708) را با استعداد به بیماری BP نشان داده‌اند. تاکنون، این مطالعات به طور مستقل تکرار نشده و همچنین ارتباط این پلی مورفیسم‌ها با بیماری BP در جمعیت ایرانی مورد مطالعه قرار نگرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه شامل ۲۰ بیمار مبتلا به BP و ۲۰ فرد کنترل است DNA ژنومی توسط روش DNG-Plus جداسازی شد. به منظور آنالیز جهش نقطه‌ای اگزون ۱۰ ژن COL17A1 (rs805708) از روش Tetra-primer ARMS PCR استفاده شد. بررسی احتمال ارتباط استعداد ژنتیکی بیمار در صورت داشتن هر یک از ژنوتیپ‌های این ژن‌ها با بیماری‌های مختلف و همچنین مواردی مانند سن و جنس نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج بررسی جهش موجود در اگزون ۱۰ ژن COL17A1 (rs805708) نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در فرکانس ژنوتیپی و الی این پلی مورفیسم در بیماران و افراد کنترل وجود ندارد ( $P > 0/05$ )

نتیجه‌گیری: مقایسه ژن جهش‌یافته در پلی مورفیسم rs805708 اگزون ۱۰ ژن COL17A1 ارتباط معناداری را با بیماری نشان نداد. این نتایج نشان می‌دهد که استعداد ژنتیکی برای ایجاد بیماری BP در نژادهای مختلف می‌تواند کاملاً متفاوت باشد.

واژگان کلیدی: COL17A1، بولوس پمفیگوئید، بیماری خود ایمنی، جهش

دانشور  
پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و نهم - شماره ۱۳۶  
شهریور ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۳  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۰۵/۰۶  
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۱

## مقدمه

است تغییرات ساختاری و کاربردی کلاژن ۱۷ نقش مهمی در بیماری BP دارد. کلاژن ۱۷ شامل ۳ زنجیره‌ی کوتاه ۱۸۰ کیلودالتونی که هر کدام با ناحیه‌ی N-Terminal و انتهای C-Terminal انعطاف‌پذیر است. هدف اصلی اتوآنتی‌بادی‌ها در بیماران BP، کلاژن ۱۷ گذرنده از غشاء همی دسموزومی و همچنین BP180 و پروتئین‌های داخل سیتوپلاسمی خانواده پلکتین BP230 است. پوست قرمز دارای کهیر همراه با خارش و تاول‌های زیرپوستی با نفوذ اتوزینوفیل‌ها، هر دو مشخصه‌ی ویژگی‌های بالینی و هیستوپاتولوژیک این بیماری است. همچنین اتوآنتی‌بادی IgE در کلاژن ۱۷ ممکن است با نفوذ اتوزینوفیل‌ها و قرمز شدن پوست و ایجاد کهیر مرتبط باشد مشاهدات نشان می‌دهد که BP دارای ویژگی‌های بالینی متفاوت است و خود ایمنی مرتبط با Th2 ممکن است در بیماری‌زایی BP نقش داشته باشد (۲).

اهمیت و ضرورت این تحقیق به دلیل عوامل ژنتیکی مورد بررسی است که می‌توانند نقش مهمی در ایجاد و شدت بیماری داشته باشند. پلی مورفیسم‌های موجود در اگزون ۱۰ ژن COL17A1 (rs805708) می‌تواند در ایجاد استعداد و یا تشدید بیماری خودایمنی نقش داشته باشد. تاکنون هیچ نتایجی مبنی بر ارتباط بین این پلی مورفیسم و ایجاد بیماری بولوس پمفیگوئید در جمعیت ایرانی ارائه نشده است. از آنجاکه این جهش‌ها می‌توانند با استعداد به بیماری بولوس پمفیگوئید مرتبط باشند و این استعداد ژنتیکی به علت تفاوت نژادی می‌تواند از یک جمعیت تا جمعیت دیگر کاملاً متفاوت باشد، این مطالعه طراحی گردید تا فرکانس پلی مورفیسم rs805708 در ژن COL17A1 در بیماران ایرانی مبتلا به بولوس پمفیگوئید در مقایسه با افراد سالم بررسی گردد.

بولوس پمفیگوئید (BP) یک بیماری تاول‌زای پوستی خود ایمنی است که با تاول‌های زیرپوستی توصیف می‌شود که بطور عمده در افراد مسن و بندرت در کودکان دیده می‌شود. در این بیماری، اتوآنتی‌بادی به پروتئین‌های ساختاری که باعث اتصال کراتینوسیت‌های اپیدرم به درم زیرین می‌شوند حمله می‌کنند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به کلاژن ۱۷ اشاره نمود. تاول‌ها همراه با خارش هستند و به صورت فوران کهیری ظاهر می‌شوند. به نظر می‌رسد اولین تظاهرات کهیری در بولوس پمفیگوئید مرتبط با IgE باشد. چون IgE واسطه‌ی دگرانولاسیون از ماست سل‌ها است؛ که معمولاً در ضایعات کهیری رخ می‌دهد یافته‌های بافت‌شناسی نشان می‌دهد که اتوآنتی‌بادی‌ها از کلاس IgE ممکن است در بیماری BP نقش داشته باشند زیرا بیان ماست سل‌ها و اتوزینوفیل‌ها شباهتی به گیرنده‌ی FcεR در سطح IgE دارد همچنین اتوزینوفیل در خون محیطی و ضایعات پوستی بیماران BP، FcεR و سطح محدودی از IgE وجود دارد (۱). مختصات ژنتیکی این بیماری هنوز به طور کامل روشن نشده است. علیرغم پیشرفت در روش‌های مولکولی نوین، هنوز راهکارهای درمانی برای بولوس پمفیگوئید محدود بوده و تأثیر این درمان‌ها از یک بیمار تا بیمار دیگر متفاوت است. ارتباط سطح بالای IL-1β با بیماری‌های خود ایمنی نشان می‌دهد که این سیتوکاین نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری‌ها ایفا می‌کند. علاوه بر این عامل و از آنجاکه ژن COL17A1 در بیماری بولوس پمفیگوئید اهمیت دارد، تغییرات ژنتیکی در ژن COL17A1 که پروتئین کلاژن ۱۷ را رمزگذاری می‌کند می‌تواند بیان پروتئینی را تغییر داده یا باعث جایگزینی اسیدآمین‌های شود که در این صورت راه را برای مولکول‌های MHC هموار کرده تا کلاژن ۱۷ را به دستگاه ایمنی ارائه کنند.

کلاژن ۱۷ یک پروتئین گذرنده از غشاء که مربوط به بیماری خود ایمنی تاولی پوستی بولوس پمفیگوئید

## روش تحقیق

### جمع آوری نمونه

در این پژوهش ۲۰ نمونه از افراد مبتلا به بولوس پمفیگوئید و ۲۰ فرد کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران مبتلا به بولوس پمفیگوئید مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهدای تجریش، لقمان حکیم و رازی در مهر و موم‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۰ به شرط اطمینان از بیماری آن‌ها به وسیله‌ی بررسی پرونده‌های بالینی و آزمایشگاهی‌شان مانند تصاویر ایمونوفلورسانس مستقیم (DIF)، تفکیک شدند. 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) انجام گرفت. در ضمن نمونه‌گیری از افراد، پرسش‌نامه‌های تدوین شده نیز توسط این افراد تکمیل شد.

### استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش DNG Plus انجام شد. سپس کیفیت DNA های استخراج شده با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ و کمیت DNA های استخراج شده با اسپکتروفوتومتر بررسی گردید.

## Tetra-primer ARMS PCR

در روش ARMS PCR برای تشخیص موتاسیون‌های نقطه‌ای بکار می‌رود و از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود. در این روش، واکنش در دو لوله‌ی جدا انجام می‌شود که یکی از آن‌ها حاوی پرایمرهای نوع موتاسیون یافته و دیگری حاوی پرایمرهای نوع معمولی است. چنانچه تکثیر در لوله‌ی حاوی پرایمر موتاسیون یافته انجام شود، در DNA هدف، موتاسیون اتفاق افتاده است و تکثیر در لوله‌ی حاوی پرایمر معمولی، نشان‌دهنده‌ی آن است که موتاسیونی اتفاق نیفتاده است. به منظور تکثیر قطعات DNA استخراج شده توسط تکنیک Tetra-primer ARMS PCR پرایمرهای اختصاصی Forward و Reverse برای اگزون ۱۰ ژن COL17A1 از مقالات معتبر (۳) استخراج شد (جدول ۱).  
مقادیر مورد نیاز برای انجام آزمایش Tetra-primer ARMS PCR در جدول ۲ و شرایط دمایی و زمان مورد نیاز برای واکنش PCR در جدول ۳ نشان داده شده است. بعد از انجام Tetra-primer ARMS PCR، ژل آگارز ۱/۵ درصد گذاشته شد.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی، غلظت، طول، Tm و اندازه محصول پرایمرهای اگزون ۱۰ ژن COL17A1

اندازه محصول	Tm	طول	توالی نوکلئوتیدی	غلظت پرایمر	پلی مورفیسم	نوع پرایمر	ژن
242 bp	50°C	17bp	5'AGGCACCTACATGCAAT3'	10 pmol/μl	10 pos 734- T	Forward	Exon 10 Gene COL17A1
	52°C	17bp	5'AGGCACCTACATGCAAC3'	10 pmol/μl	10 pos 734-C	Forward	
	50°C	17bp	5'CAAACATTCTGAGGGTC3'	10 pmol/μl	-	Reverse	

### جدول ۳. شرایط دمایی و زمان مورد نیاز برای انجام واکنش Tetra-primer ARMS PCR

چرخه	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
5	25 sec	95
	45sec	70
	25sec	72
21	25sec	95
	50sec	65
	30sec	72
4	30sec	95
	60esc	55
	90esc	72

### جدول ۲. مواد و حجم‌های مورد نیاز جهت انجام واکنش Tetra-primer ARMS PCR

حجم مورد استفاده (μl)	مواد مورد نیاز
5.12	Master mix
1	Forward primer
1	Reverse primer
5.8	Water(DDW)
2	Sample(DNA)
25	Total

### آنالیز آماری

(۹۵٪ CI) به منظور بررسی فاکتورهای خطر استفاده شد. همه مقادیر P دودمه بودند و CI ها در ۹۵٪ تنظیم گردید. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج بررسی آماری اطلاعات دموگرافیک افراد بیماران مبتلا به BP و افراد کنترل

با استفاده از اطلاعات به دست آمده از پرسشنامه تکمیل شده توسط افراد بیمار مبتلا به BP و کنترل، آنالیز آماری توسط برنامه SPSS نسخه ۲۳ انجام شد بررسی آماری اطلاعات دموگرافیک افراد بیماران مبتلا به BP و افراد کنترل نشان می دهد که تنها ابتلا به کم خونی، سابقه اگزمای پوستی، کاهش شدید وزن و فراموشی دارای رابطه معنی دار با این بیماری هستند که در جدول به صورت برجسته نشان داده شده است. (جدول ۴).

آنالیز آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. نتایج متغیرهای کمی به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار و نتایج متغیرهای کیفی به شکل تعداد و فراوانی عنوان گردید. برای مشخص کردن توزیع نرمال داده ها 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 k-Independent و Independent Sample test استفاده شده است. تمام این اطلاعات اندازه گیری شده در جدول دموگرافیک بیان شد. آزمون مجذور کای ( $\chi^2$ ) برای بررسی ارتباط بین آنالیز جهش نقطه ای اکزون ۱۰ ژن COL 17 A در بیماری BP و ارتباط آن ها با مشخصات دموگرافیکی و کلینیکی استفاده گردید. از آزمون لوجستیک رگرسیون برای اندازه گیری نسبت شانس (OR) و ضریب اطمینان ۹۵٪

جدول ۴. آنالیز آماری اطلاعات دموگرافیک افراد بیماران مبتلا به BP و افراد کنترل

P value	گروه کنترل	گروه بیمار	خصوصیت	
			جنس (%) n	زن مرد
۰/۲۷۸	۱۰(٪۵۰)	۱۴(٪۷۰)		
۰/۱۹۶	۶۴/۴۵ $\pm$ ۲/۵۹	۶۹/۶۵ $\pm$ ۲/۹۸		
-	-	۲۰/۲۵ $\pm$ ۶/۲۷		
-	-	۶۷/۵۰ $\pm$ ۳		
۰/۳۱۱	*	۱(٪۵)		
۰/۲۰۴	۷(٪۳۵)	۱۱(٪۵۵)		
۰/۷۰۵	۴(٪۲۰)	۵(٪۲۵)		
۰/۰۰۲	*	۸(٪۴۰)		
۱	۳(٪۱۵)	۳(٪۱۵)		
۰/۰۵۷	۱۲(٪۶۰)	۶(٪۳۰)		
۰/۱۴۷	۰(٪۰)	۲(٪۱۰)		
۰/۰۰۶	۱۰(٪۵۰)	۲(٪۱۰)		
۰/۰۳۵	*	۴(٪۲۰)		
۰/۱۴۷	*	۲(٪۱۰)		
۰/۱۱۴	۲(٪۱۰)	۶(٪۳۰)		
۰/۰۰۳	۱۲(٪۶۰)	۳(٪۱۵)		
۰/۰۷۷	۱(٪۵)	۵(٪۲۵)		
۰/۰۵۷	۱۲(٪۶۰)	۶(٪۳۰)		
۰/۵۲۵	۸(٪۴۰)	۱۰(٪۵۰)		
۰/۰۵۸	۱۳(٪۶۵)	۷(٪۳۵)		
۰/۲۸۸	۴(٪۲۰)	۷(٪۳۵)		
		۶(٪۳۰)	متوسط (کمتر از ۵۰ درصد)	شدت بیماری (%) n
		۱۴(٪۷۰)	شدید (بیشتر از ۵۰ درصد)	

( $P = 0.06$ ) (جدول ۵).

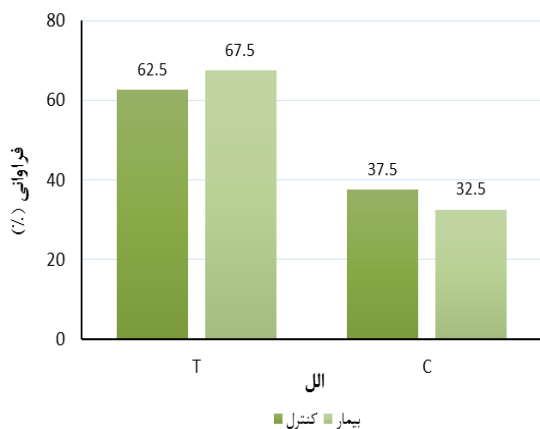
نمودار توزیع ژنوتیپ ها پلی مورفیسم rs805708 اگزون ۱۰ ژن COL17A1. (شکل ۱) نشان می‌دهد که ژنوتیپ TC که هتروزیگوت جهش یافته است، در تمامی نمونه‌های کنترل فراوانی را وجود دارد. در افراد بیمار، TT و TC بیشترین فراوانی را دارد. نمودار فراوانی اللی (شکل ۲) نشان می‌دهد که تنها اللی جهش نیافته T در افراد بیمار و کنترل بیشترین فراوانی را دارد.

نتایج ارتباط بین پلی مورفیسم rs ۸۰۵۷۰۸ اگزون ۱۰ ژن COL17A1 در بیماری بولوس پمفیگوئید

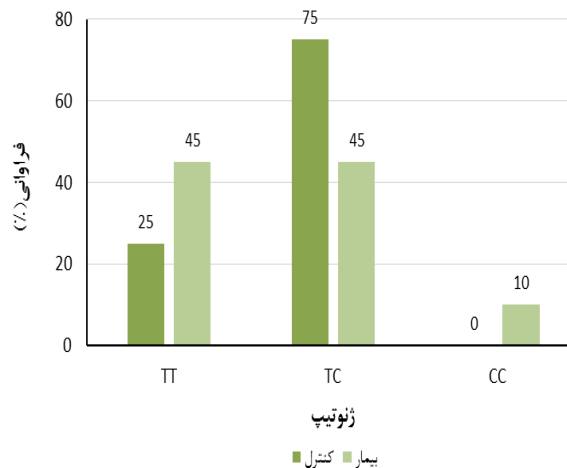
برای بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم rs ۸۰۵۷۰۸ اگزون ۱۰ ژن COL17A1 در بیماری بولوس پمفیگوئید از تکنیک Tetra-primer ARMS PCR استفاده شد. در بیماران، اکثر افراد دارای ژنوتیپ های TC و CC بودند، درحالی‌که در افراد کنترل، اکثریت ژنوتیپ TC داشتند ( $P < 0.05$ ). مقایسه اللی بیماران و افراد کنترل نشان داده شده که اکثریت افراد بیمار و کنترل دارای اللی T بوده‌اند که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است

جدول ۵. فراوانی اللی و توزیع ژنوتیپ اگزون ۱۰ ژن COL17A1 در بیماران مبتلا به بولوس پمفیگوئید و افراد کنترل

ژن	اللی / ژنوتیپ	کنترل	بیمار	OR	95% CI	P Value	
COL17A1	ژنوتیپ	TT	۹ (%۴۵)	۰/۴	۰/۱۰-۱/۵۵	۰/۱۹	
		TC	۱۵ (%۷۵)				
		CC	-				
	اللی	مجموع	۲۰ (%۱۰۰)	۲۰ (%۱۰۰)	۰/۸	۰/۳-۰/۲	۰/۶
		T	۲۵ (%۶۲/۵)	۲۷ (%۶۷/۵)			
		C	۱۵ (%۳۷/۵)	۱۳ (%۳۲/۵)			



شکل ۲. فراوانی آلی پلی مورفیسم rs805708 اگزون ۱۰ ژن COL17A1 در بیماران مبتلا به BP و افراد کنترل



شکل ۱. فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم rs805708 اگزون ۱۰ ژن COL17A1 در بیماران مبتلا به BP و افراد کنترل

در ارتباط با اطلاعات دموگرافیک و ویژگی‌های بالینی با پلی مورفیسم اگزون ۱۰ ژن COL17A1، هدف از انجام این ارزیابی، بررسی احتمال ارتباط استعداد ژنتیکی بیمار با ویژگی‌های بالینی در صورت داشتن ژنوتیپ جهش نیافته (CC) و یا ژنوتیپ های جهش یافته (TC + TT) بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تنها بین کم‌خونی با این پلی مورفیسم ارتباط معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0.05$ ) که جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶. ارتباط اطلاعات دموگرافیک و ویژگی‌های بالینی با پلی مورفیسم rs805708 اکزون ۱۰ ژن COL17A1 در بیماران

P Value	OR	95% CI	CC میانگین/تعداد (%)	TC میانگین/تعداد (%)	TT میانگین/تعداد (%)	تعداد کل ۲۰	ویژگی‌ها
۰/۴۶۵	-	-	۶۳±۱۶	۶۷/۱۱±۳/۴۵	۷۳/۶۶±۴/۸۸	۶۹/۶۵±۲/۹۸	سن (سال)
۰/۴۷۴	-	-	۱۲	۱۳/۳۳±۴/۶۳	۲۹±۱۲/۹۸	۲۰/۲۵±۶/۲۷	سن شروع بیماری (ماه)
۰/۵۳۸	-	-	۶۲±۱۶	۶۵±۳/۸۳	۷۱/۲۲±۴/۷۴	۶۷/۵۰±۳	مدت زمان ابتلا (سال)
۰/۵	۱/۶۹	۰/۳۵-۸	-	۳(٪۱۵)	۳(٪۱۵)	۶(٪۳۰)	جنس، مرد
			۲(٪۱۰)	۶(٪۳۰)	۶(٪۳۰)	۱۴(٪۷۰)	جنس، زن
۰/۹۹	۱۲	-	-	-	۱(٪۵)	۱(٪۵)	وجود سابقه خانوادگی n(٪)
۰/۹۱	۱/۰۷	۰/۲-۴/۱	۱(٪۵)	۵(٪۲۵)	۵(٪۲۵)	۱۱(٪۵۵)	دارا بودن استرس n(٪)
۰/۸۴	۱/۱۷	۰/۲-۵/۶	۱(٪۵)	۱(٪۵)	۳(٪۱۵)	۵(٪۲۵)	ابتلا به افسردگی مزمن n(٪)
۰/۰۳	۷/۸	۱/۱-۵۵/۹	-	۲(٪۱۰)	۶(٪۳۰)	۸(٪۴۰)	ابتلا کم‌خونی n(٪)
۰/۳۳	۰/۳۹	۰/۰۶-۲/۵	۱(٪۵)	۱(٪۵)	۱(٪۵)	۳(٪۱۵)	تغییرات هورمونی n(٪)
۰/۴۱	۰/۵۴	۰/۱۲-۲/۳	۲(٪۱۰)	۱(٪۵)	۳(٪۱۵)	۶(٪۳۰)	ابتلا به بیماری‌های عفونی، انگلی، قارچی n(٪)
۰/۷۳	۱/۵	۰/۱۳-۱۶/۷۶	-	۱(٪۵)	۱(٪۵)	۲(٪۱۰)	استفاده از قرص ضدبارداری n(٪)
۰/۹۹	-	-	-	-	۲(٪۱۰)	۲(٪۱۰)	سابقه آگزمای پوستی n(٪)
۰/۷۳	۰/۷۵	۰/۱۴-۳/۸	-	۳(٪۱۵)	۱(٪۵)	۴(٪۲۰)	کاهش شدید وزن n(٪)
۰/۴۳	۰/۴۲	۰/۰۴-۳/۷	-	۲(٪۱۰)	-	۲(٪۱۰)	سابقه ابتلا به سایر بیماری‌های پوستی n(٪)
۰/۵۰	۱/۶۹	۰/۳۵-۸/۰۸	۱(٪۵)	۱(٪۵)	۴(٪۲۰)	۶(٪۳۰)	وجود اختلالات عصبی n(٪)
۰/۳۳	۰/۳۹	۰/۰۶-۲/۵	۱(٪۵)	۱(٪۵)	۱(٪۵)	۳(٪۱۵)	فراموشی n(٪)
۰/۱۹	۰/۳۳	۰/۰۶-۱/۷۲	۱(٪۵)	۳(٪۱۵)	۱(٪۵)	۵(٪۲۵)	مصرف مشروبات الکلی یا دخانیات n(٪)
۰/۵۰	۱/۶۹	۰/۳۵-۸/۰۸	۱(٪۵)	۱(٪۵)	۴(٪۲۰)	۶(٪۳۰)	آلرژی یا حساسیت n(٪)
۰/۳۱	۲/۰۷	۰/۴۹-۸/۶	۱(٪۵)	۳(٪۱۵)	۶(٪۳۰)	۱۰(٪۵۰)	سابقه بیماری قلبی عروقی n(٪)
۰/۷۴	۰/۷۹	۰/۱۹-۳/۲	-	۵(٪۲۵)	۲(٪۱۰)	۷(٪۳۵)	فشارخون بالا n(٪)
۰/۶۹	۱/۳۳	۰/۳۱-۵/۶	-	۴(٪۲۰)	۳(٪۱۵)	۷(٪۳۵)	ابتلا به دیابت n(٪)
۰/۹۴	۱/۰۵	۰/۲-۴/۵۴	۱(٪۵)	۷(٪۳۵)	۶(٪۳۰)	۱۴(٪۷۰)	شدت بیماری
			۱(٪۵)	۲(٪۱۰)	۳(٪۱۵)	۶(٪۳۰)	متوسط n(٪)

### بحث

به‌نوبه‌ی خود به عنوان پل مولکولی بر پایه کراتین اسکلت سلولی عمل می‌کند. ناحیه‌ی بیرونی کلاژن ۱۷ در لنگرگاه فیبرهایی از همی دسموزوم‌ها و روی لامینا لوسیدا برای رسیدن به لامینا دنسا قرار گرفته است. جهش در ژن COL17A1 منجر به عدم وجود کلاژن ۱۷ می‌شود و یا بیان پروتئین تغییر ساختاری پیدا می‌کند. حذف دامنه‌ی سیتوپلاسمیک کلاژن ۱۷ منجر به بیماری اپیدرما بلوزا می‌شود. بر اساس این مشاهدات، ناحیه خارجی کلاژن ۱۷، نقش مهمی در تحکیم کراتینوسیت‌های پایه و پایداری اتصالات پوستی-اپیدرما دارد. با این حال، آن‌ها عملکرد مهمی در ناحیه خارجی برای اتصال لامینین ۵ و تحریک

کلاژن ۱۷ (180KD, BPAG2) آنتی‌ژن بولوس پمفیگوئید) توسط سلول‌های اپیتلیال همی دسموزوم‌ها (HD) مانند کراتینوسیت‌های پایه در پوست یا مخاط بیان می‌شود. HD ها ترکیبات چند پروتئینی هستند شبکه‌ی کراتین درون‌سلولی، چسبیده به رشته‌ها و فیبریل‌ها در غشاء پایه واقع شده است. کلاژن ۱۷ یک پروتئین گذرنده از غشاء است زیرا دارای بخش‌های N-terminus داخل سلولی یا C-terminus خارج سلولی است. دامنه‌ی درون‌سلولی کلاژن ۱۷ واقع در یک پلاک داخل سیتوپلاسمی است که در آن با دم درون‌سلولی ارتباط برقرار می‌کند. زیرمجموعه اینتگرین  $\beta 4$ , BPAG1 (230 KD) آنتی ژن بولوس پمفیگوئید و HD1 / پلکتین

بیماران IgE با دامنه‌ی NC16A از BP180 واکنش داد IgE پوشیده شده‌ی ماست سل‌ها در زخم پوست بیماران BP تشخیص داده شد. هیستامین آزاد شده با تحریک BP180 در بازوفیل به دست آمده از بیماران درمان‌نشده در مقایسه با بیماران BP درمان شده ( $P=0/01$ ) به طور قابل توجهی بالاتر بود. نتیجه به دست آمده فرضیه‌ی نقش اتوآنتی بادی IgE در بیماری‌زایی BP را مشخص می‌کند (۷).

در مطالعه‌ای که Lee و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، ۱۶۸ بیمار مبتلا به بولوس پمفیگوئید مورد بررسی قرار گرفت. ۵۰ درصد بیماران زن و ۵۰ درصد مرد بودند. حدود ۲۷ درصد آن‌ها بیماری را به شکل شدید نشان دادند ( $P>0.05$ ) میانگین سن بیماران مورد بررسی ۷۳ سال بود. در بررسی این محققین، دیابت و فشارخون بالا ارتباط معنی‌داری با بروز این بیماری داشتند ( $P<0.05$ ) (۸).

در بررسی که ما در جمعیت ایرانی افراد بیمار BP و افراد کنترل انجام دادیم، نتایج نشان داد که تنها بین ابتلا به بیماری BP با عامل کم‌خونی ( $P \text{ value}=0.002$ )، سابقه‌ی آگزمای پوستی ( $P \text{ value}=0.006$ )، کاهش وزن شدید ( $P \text{ value}=0.035$ )، فراموشی ( $P \text{ value}=0.003$ ) ارتباط معنی‌داری وجود دارد؛ که به این ترتیب، بین دیگر ویژگی‌های بالینی و ابتلا به بیماری BP ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

در یک مطالعه Barrick BJ و همکارانش در دانشگاه کانزاس سیتی بررسی مرگ بیماران مبتلا به بولوس پمفیگوئید بر اساس افزایش سن و محل زندگی‌شان انجام دادند. نتایج، افزایش نرخ سپسیس، ( $p = 0.031$ ) الزایمر ( $p = 0.049$ ) و اختلال افسردگی ( $P = 0.005$ ) را در گروه مورد مطالعه نشان داد. همچنین عفونت‌های مکرر منجر به مرگ در گروه مورد مطالعه ( $P = 0.035$ ) پیدا شد (۹).

در مطالعه ما، ۷۰ درصد از بیماران، زن و ۳۰ درصد مرد بودند ( $P>0.05$ ). میانگین سن بیمارانی که ما مطالعه کردیم، ۶۹ سال بود ( $P>0/05$ ). در بیماران مورد بررسی

کراتینوسیت‌های پایه دارند (۴). از آنجایی که پروتئین‌های همی دسموزومال به تثبیت کراتینوسیت‌های پایه به غشاء کمک می‌کند، اختلال در عملکرد آن‌ها یا از طریق نقص ژنتیکی یا مکانیسم‌های ایمنی‌شناختی، منجر به جدایی درم-اپیدرم که دارای ساختار فوق‌العاده در لامینا لوسیدا است، می‌شود (۵)

آنتی‌بادی‌های ضد BP230 به طور مستقیم به بیماری‌زایی BP کمک می‌کنند. همچنین اتصال آنتی‌بادی‌های BP به همی دسموزوم به اثر متقابل بافت همبندی اپیدرمال اختلال ایجاد نمی‌کند. کلاژن ۱۷ دارای ۱۴۹۷ اسیدآمینو است؛ و دارای ۱۵ ناحیه کلاژنیک در ماتریکس خارج سلولی و خوشه‌های اپی توپ محکم در دامنه‌ی NC16A هستند. بیشتر از ۹۰٪ از اتوآنتی‌بادی‌های IgG از بیماران مبتلا، به IgG در این منطقه واکنش نشان می‌دهند و چنین واکنش‌هایی به شدت به فعالیت بیماری BP بستگی دارد. بعلاوه برای هدف قرار دادن ناحیه NC16A، اتوآنتی‌بادی‌های BP ممکن است هدف دیگر قسمت‌های COL17 قرار بگیرند از جمله منطقه‌ی C-ترمینال که عمدتاً هدف قرار گرفته است. اتوآنتی‌بادی‌های IgG از بیماران با غشاء مخاطی پمفیگوئید، یکی دیگر از اختلالات تاولی، شامل کلاژن ۱۷ است. در این مطالعات نشان داده شد که بیماری‌زایی و هدف قرار دادن آنتی‌بادی COL17 می‌تواند وابسته به اپی توپ باشد (۶).

Dimson OG و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی ارتباط بالقوه اتوآنتی بادی IgE در ۹۱ بیمار که در مطالعات شرکت کردند کار کردند. سرم IgE اندازه‌گیری شد و از دو نشانه در ایمونوفلورسانس استفاده شد در آنتی بادی‌های خاص انسان، تریپتاز ماست سل، IgE و BP180 انجام شد. سپس هیستامین آزاد شده اندازه‌گیری شد. از بازوفیل بیماران درمان‌نشده ( $n=9$ )، بیماران BP تحت درمان سرکوب‌کننده‌ی سیستم ایمنی ( $n=9$ ) و شاهد ( $n=16$ ) سطح IgE بالا در ۷۰٪ از بیماران درمان‌نشده BP پیدا شد. اتوآنتی بادی IgE علیه BP180 در ۹۰٪ از بیماران درمان‌نشده پیدا شد؛ اما در یکی از

است که لازم است مطالعه در جمعیت بیشتر مجدداً بررسی شود چراکه ممکن است عدم معنی داری روابط به دلیل کوچک بودن جمعیت مورد مطالعه بوده باشد. (3) در صورتی که نتایج حاصل از مطالعه ما رابطه‌ی معنی داری بین پلی مورفیسم بررسی شده و بیماری BP در جمعیت ایرانی نشان نداد.

مطالعات انجام شده روی ژن rs805708 اگزون ۱۰ COL17A1 در جمعیت ایرانی مورد مطالعه نشان داده شد که در بیماران BP، اکثر افراد دارای ژنوتیپ های TC و CC بودند، در حالی که در افراد کنترل، اکثریت ژنوتیپ TC داشتند ( $P \text{ value} > 0/05$ ). مقایسه اللی بیماران و افراد کنترل نشان داد که اکثریت افراد بیمار و کنترل هم دارای الل T بودند؛ که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی دار نبوده است ( $P \text{ value} > 0/05$ ). همچنین اطلاعات دموگرافیک و ویژگی‌های بالینی با پلی مورفیسم rs805708 اگزون ۱۰ COL17A1 نشان می‌دهد که در جمعیت ایرانی تنها بین کم‌خونی با این پلی مورفیسم ارتباط معنی دار وجود دارد ( $P \text{ value} > 0/03$ ).

از محدودیت‌های تحقیق می‌توان به مشکلات نمونه‌گیری اشاره کرد. با توجه به اینکه سن ابتلا به این بیماری، اغلب سنین بالای ۶۰ است، نمونه‌گیری از افراد در این سن کار آسانی نیست. همچنین تعداد بیماران مبتلا به بولوس پمفیگویید مراجعه‌کننده به بیمارستان در هر سال، تعداد زیادی نیست.

با بررسی نتایج به دست آمده از این مطالعه به این نتیجه می‌رسیم که عدم ارتباط معنی دار این پلی مورفیسم در جمعیت ایرانی مورد مطالعه و مقایسه‌ی آن با سایر مطالعات می‌تواند به علت تعداد نمونه‌های بررسی شده، منطقه جغرافیایی و از طرفی پیوستگی ژن‌ها باشد

#### منابع

1. Dooley MA, Hogan SL. Environmental epidemiology and risk factors for autoimmune disease. *Current Opinion Rheumatology* 2003; 15: 99-103.

ما، دیابت و اختلالات عصبی معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ) اما ابتلا به فشارخون بالا در مرز معنی داری قرار داشت ( $P=0.058$ ).

مطالعات انجام شده روی ژن rs805708 اگزون ۱۰ COL17A1 در جمعیت ایرانی مورد مطالعه نشان داده شد که در بیماران BP، اکثر افراد دارای ژنوتیپ های TC و CC بودند، در حالی که در افراد کنترل، اکثریت ژنوتیپ TC داشتند ( $P \text{ value} > 0/05$ ). مقایسه اللی بیماران و افراد کنترل نشان داد که اکثریت افراد بیمار و کنترل هم دارای الل T بودند؛ که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی دار نبوده است ( $P \text{ value} > 0/05$ ). همچنین اطلاعات دموگرافیک و ویژگی‌های بالینی با پلی مورفیسم rs805708 اگزون ۱۰ COL17A1 نشان می‌دهد که در جمعیت ایرانی تنها بین کم‌خونی با این پلی مورفیسم ارتباط معنی دار وجود دارد ( $P \text{ value} > 0/03$ ).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ توسط وینسی و همکارانش انجام شد، ۱۹ پلی مورفیسم مختلف در اگزون‌ها و اینترون های ژن COL17A1 مورد بررسی قرار گرفت و با مقایسه آن‌ها در گروه کنترل و بیمار ارتباط این پلی مورفیسم‌ها با بیماری ارزیابی شد که همه‌ی آن‌ها از نوع جایگزینی بودند که ۱۳ جهش از نوع جایگزینی ترانزیشن مانند  $G \rightarrow A$  یا  $C \rightarrow T$  است و ۶ تغییر باقیمانده از نوع ترانس ورژن یعنی  $G \rightarrow C$  یا  $A \rightarrow T$  است. ۱۲ SNP در منطقه‌ی غیر کد شونده است و باقیمانده در منطقه‌ی کد شونده قرار گرفته است (شکل ۴-۲) (جدول ۴-۱). در مطالعه حاضر، پلی مورفیسم موجود در اگزون ۱۰ در جمعیت ایرانی مبتلا به BP مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مطالعه‌ی وینسی بین هیچ کدام از پلی مورفیسم‌ها و بروز بیماری هیچ ارتباط معناداری دیده نشده بود ولی خود محقق اعلام کرده

2. Messingham KN, Srikantha R, Degueme AM, Fairley JA. FcR-independent effects of IgE and IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. *Journal of Immunology* 2011; 187: 553-60.



3. Winnsy S, Lonie L, Allen J, Bunce M, Marshall SE, Wojnarowska F. Genetic variation in COL17A1 and the development of bullous pemphigoid. *Expert Dermatology* 2004; 13: 140-7
4. Tasanen K, Tungal L, Chometon G, Bruckner L, Aumailley M. Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. *American Journal of Pathology* 2004; 164: 2027-38
5. Chiriac MT, Licarete E, Sas AG, Rados AM, Lupan I, Chiriac AM, et al. Passive transfer of collagen XVII-specific antibodies induces sustained blistering disease in adult mice. *Orphanet Journal of Rare Disease* 2013; 8: 17
6. Hiroyasu S, Ozawa T, Kobayashi H, Ishii M, Aoyama Y, Kitajima A, et al. Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization via a macropinocytic pathway. *American Journal of Pathology* 2013; 182: 828-40
7. Dimson OG, Giudice GJ, Fu CL, Vin den berg F, Warren SJ, Janson MM, et al. Identification of a potential effector function for IgE autoantibodies in the organ-specific autoimmune disease bullous pemphigoid. *Journal of Investigation Dermatology* 2003; 120: 784-8.
8. Lee IJ, Kim SC, Kim HS, Bang D, Yang WI, Jung WH, et al. Paraneoplastic pemphigus associated with follicular dendritic cell sarcoma arising from Castleman's tumor. *Journal of American Academic Dermatology* 1999; 40: 294-7
9. Barankin B, Freiman A. Misnomers in dermatology. *Journal of Medical Surgery* 2005; 9: 284-8.

## Investigation of mutation in Exon 10 of COL17A1 in patients with Bullous pemphigoid

Sedigheh Haj Manoochehri<sup>1</sup>, Pardis Sadat Tabatabaei Panah<sup>1\*</sup>, Reza Akbarzadeh<sup>2</sup>

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](mailto:tabatabaeipanah@gmail.com)

### Abstract

**Background and Objective:** Bullous pemphigoid (BP) is the most frequently occurring entity among autoimmune bullous skin diseases. Although the genetic determinants of BP have not been precisely elucidated, some studies have shown an association between a mutation in Exon 10 of COL17A1 gene (rs805708) and BP disease susceptibility. Yet, these findings had so far not been independently replicated, and no data on a possible association of these mutations and BP in Iranian population were available.

**Materials and Methods:** This study contained 20 BP patients and 20 healthy controls. Genomic DNA was isolated using DNG-plus. The mutation in Exon 10 of COL17A1 gene (rs805708) was evaluated by using tetra-primer ARMS PCR method. Several relevant information such as demographic data (age, gender, and so forth) or clinical characteristics were analyzed for a possible effect of these factors on susceptibility to BP in patients.

**Results:** The results of the mutation in Exon 10 of COL17A1 gene (rs805708) showed no significant difference between patients and controls ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** Comparison of mutant genotype in a mutation in Exon 10 of COL17A1 gene (rs805708) showed no significant difference. These results show that the genetic predisposition to develop BP can greatly varies among different ethnic groups.

**Keywords:** COL17A1, Bullous pemphigoid, Autoimmune disease, Mutation