مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن PTEN در بیماران مبتلابه اسپاندیلیت آنکیلوزان

نویسندگان:

سید محمد طاهری[۱]، خدیجه عنصری*[۱]، وحید شریعتی[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

۲- مرکز ژنوم، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.15, No.4, Winter 2018

چکیده:

مقدمه: آنکیلوزان اسپوندیلیت (Ankylosing spondylitis, AS)، شایع‌ترین شکل اسپوندیلار آتروپاتی و یک اختلال التهابی چندین گانه مزمن و پیشرفته است که به‌طور مشخص روی مفصل ساکرولیایک و اسکلت محوری تأثیر می‌گذارد. پروتئین کد شونده توسط ژن PTEN به‌واسطه فعالیت فسفاتازی خود، نقش کلیدی در بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ حیاتی همچون تنظیم چرخه سلولی، مهاجرت سلولی، آپوپتوز و رگ زایی ایفا می‌کند. این مطالعه به بررسی میزان بیان این ژن در مبتلایان به این عارضه و مقایسه آن با افراد سالم در جمعیت ایرانی پرداخته است.

روش کار: پژوهش حاضر در قالب یک مطالعه مورد- شاهدی متشکل از ۵۰ بیمار مبتلابه اسپوندیلیت آنکیلوزان و ۵۰ نفر سالم به‌عنوان کنترل از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان شهدای تجریش تهران در سال ۱۳۹۴ انتخاب شدند. استخراج RNA از لنفوسیت‌های خون افراد جمع‌آوری و سپس میزان بیان ژن PTEN با استفاده از تکنیک Real-time PCR در هر دو گروه بررسی شد. تجزیه‌وتحلیل آماری با کمک نرم‌افزار Grafpad prism 6 و SPSS (version 19) و با به‌کارگیری آزمون تی مستقل انجام شد. مقادیر P< ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: کاهش معناداری در میزان بیان PTEN در افراد مبتلابه اسپوندیلیت آنکیلوزان در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت (P=۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش میزان قابل‌ملاحظه بیان ژن PTEN در بیماران مبتلابه اسپوندیلیت آنکیلوزان در مقایسه با افراد سالم، می‌توان از شاخص میزان بیان ژن PTEN به‌عنوان یک پارامتر بالینی به‌منظور غربالگری اولیه افراد دارای ریسک ابتلا به اسپوندیلیت آنکیلوزان استفاده کرد.

واژگان کلیدی: اسپوندیلیت آنکیلوزان، ژن PTEN، Real-time PCR

Pars J Med Sci 2018;15(4):21-28

مقدمه:

آنکیلوزان اسپوندیلیت رایج‌ترین شکل از اسپوندیلوآرتروپاتی و یک بیماری مزمن و پیش‌رونده چند سیستمی بوده که با اختلال التهابی مشخص اسکلت محوری و مفاصل ساکروایلیاک همراه است. در این بیماری لیگامان‌های اطراف ستون مهره در محل اتصال به مهره‌ها دچار التهاب می‌شوند و شکل آن‌ها تغییر می‌کند. این امر موجب تحریک سلول‌های استخوان‌ساز و درنهایت تبدیل لیگامان ها به استخوان می‌شود [۱]. به‌مرورزمان این استخوان‌ها بزرگ‌تر شده و چون خود لیگامان ها از اطراف به مهره‌های مجاور متصل هستند، استخوان‌های ایجادشده در درون رباط‌ها همچون پلی بین مهره‌های مجاور اتصال برقرار کرده و مهره‌ها را به هم وصل می‌کند. به‌عبارت‌دیگر، پس از مدتی مهره‌های ستون مهره به هم متصل شده و حرکت بین آن‌ها از بین می‌رود [۲]؛ بنابراین می‌توان گفت که AS یک بیماری التهابی است که با تشکیل استخوان جدید شناخته می‌شود [۳]. آنکیلوزان اسپوندیلیت چالش‌های قابل‌توجهی در زمینه تشخیص زودهنگام، ارزیابی فعالیت بیماری، پیش‌بینی پاسخ به درمان و پیشگیری از پیشرفت رادیوگرافی را مطرح می‌کند [۴].

نرخ مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری در آسیا ۰/۸۹ درصد و در چین ۱/۸۳ درصد است که عمدتاً جوانان ۲۴ تا ۴۳ سال را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۵]. اگرچه در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در

* نویسنده مسئول، نشانی: ایران، پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، گروه زیست‌شناسی.

تلفن تماس: ۰۹۱۹۱۰۲۰۸۹۰ پست الکترونیک:onsory@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۷ اصلاح: ۱۳۹۶/۱۲/۶ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۶

رابطه با این بیماری انجام‌گرفته است، ولی پاتوژنز آن تاکنون مشخص نشده است [۶]. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که شیوع این بیماری در افرادی که به‌صورت دستی و یا برای مدت‌زمان طولانی به‌صورت ایستاده کار می‌کنند، بیشتر از دیگر افراد است. شیوع اسپوندیلیت انکیلوزان ۰/۵-۰/۲ درصد در کل جهان می‌باشد که در اواخر سن بلوغ و اوایل بزرگ‌سالی بروز می‌کند [۷]. بر اساس آمار منتشرشده در ایالات‌متحده، به‌طور تقریبی از هر ۱۰۰ هزار نفر، ۱۲۹ نفر به این بیماری دچار می‌شوند. در ایران نیز بر مبنای آمار انتشاریافته توسط انجمن روماتیسم، تعداد کل مبتلایان به این عارضه در حدود ۱۴۰هزار نفر تخمین زده‌شده است [۸].

با توجه به شیوع نسبتاً قابل‌توجه این بیماری در سطح جهان، مطالعات متعددی به‌منظور شناسایی عوامل خطر ابتلا به این بیماری انجام‌شده است. شواهد به‌دست‌آمده حاکی از نقش عوامل میکروبی و ژنتیکی در بروز آن می‌باشد [۸]. بر این اساس، یک عفونت میکروبی خاص می‌تواند به‌واسطه ایجاد اختلال در نحوه فعالیت سلول‌های ایمنی بدن به‌عنوان یک عامل مستعد کننده در بروز بیماری عمل کند. از سوی دیگر، وجود سابقه خانوادگی مثبت ابتلا به بیماری در بستگان نزدیک می‌تواند شانس ابتلا به این بیماری را به میزان ۲۰ الی ۳۰ برابر در مقایسه با سایر افراد افزایش دهد که این امر به‌وضوح بیانگر نقش عوامل ژنتیکی در بروز این بیماری است [۱۰].

بر این اساس پژوهش‌های متعددی به‌منظور شناسایی عوامل ژنتیکی مرتبط با انکیلوزان اسپوندیلیت انجام‌شده است. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از ارتباط ژن PTEN به‌عنوان یکی از ژن‌های مطرح درگیر در تنظیم سیستم خود ایمنی بدن و بروز بیماری‌های مرتبط با نقص سیستم ایمنی همچون انکیلوزان اسپوندیلیت است. این ژن، کد کننده پروتئینی است که همولوگ فسفاتاز و تنسین می‌باشد. به‌عبارت‌دیگر، پروتئین کد شونده یک فسفاتیدیل اینوزین ۳،۴،۵ تریس فسفات ۳ فسفات بوده که دارای یک دمین تنسین مانند می‌باشد. این امر بدان معناست که برخلاف اکثر تیروزین فسفاتازها، این پروتئین سوبستراهای فسفواینوزید را دفسفوریله می‌کند. با توجه به نقش این پروتئین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی فسفاتیدیل اینوزیتول-۳،۴،۵-تری فسفات، بروز هرگونه تغییر درروند رونویسی و یا بیان ژن PTEN می‌تواند اثرات بسیار مخرب در چرخه‌های مهم زیستی همچون رشد، حرکت سلولی و نیز نوآرایی سلولی ایفا کرده و بدین ترتیب منجر به بروز انواع سرطان‌ها و بیماری‌های خود ایمنی شود [۲].

با توجه به اهمیت ژن PTEN در بروز بیماری‌های خود ایمنی، تاکنون مطالعات متعددی به‌منظور شناسایی سازوکار دقیق عملکرد این ژن در فرآیند بیماری‌زایی بیماری‌هایی همچون مولتیپل اسکلروزیس، آلزایمر و روماتوئید آرتریت به‌عنوان مهم‌ترین بیماری‌های خود ایمنی انجام‌گرفته است. بااین‌حال، ارتباط دقیق میان این ژن و انکیلوزان اسپوندیلیت همچنان ناشناخته باقی‌مانده است. ازاین‌رو، مطالعه حاضر بر آن است تا به بررسی میزان بیان این ژن در مبتلایان به انکیلوزان اسپوندیلیت و مقایسه آن با افراد سالم در جمعیت ایرانی بپردازد.

روش کار:

مطالعه مورد- شاهدی حاضر متشکل از ۵۰ بیمار مبتلابه آنکیلوزان اسپوندیلیت به‌عنوان گروه مورد و ۵۰ فرد سالم بدون سابقه ابتلا به آنکیلوزان اسپوندیلیت و یا هرگونه بیماری‌های سیستم ایمنی، بیماری‌های عفونی، سرطان و نیز عدم مصرف داروهای ضدالتهابی یا کورتیکواستروئیدی بود. هر دو گروه شرکت‌کننده در مطالعه ازلحاظ سنی همسان شده و محدوده سنی بیماران بین ۳۲ تا ۷۴ سال و محدوده سنی افراد سالم بین ۳۱ تا ۷۸ سال بود. شرکت‌کنندگان در این پژوهش از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان شهدای تجریش در سال ۱۳۹۴ و طبق نظر پزشک متخصص روماتولوژیست انتخاب شدند. پس از اخذ رضایت‌نامه‌ای منطبق بر رهنمود اخلاقی از تمام شرکت‌کنندگان و دریافت کد اخلاق، مقدار ۳ میلی‌لیتر خون وریدی آن‌ها به فالکون حاوی EDTA ۰/۵ مولار به آزمایشگاه انتقال یافت.

استخراج RNA از خون طبق پروتکل کیت‌های RNX plus (شرکت سیناژن) انجام گرفت. به‌منظور تعیین غلظت و کیفیت RNA استخراج‌شده از تکنیک اسپکتوفتومتر با استفاده از دستگاه NanoDrop (Thermo Scientific) و نیز انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از آنزیم ترنس کریپتاز معکوس و طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز انجام شد. از الیگو dT به عنوان پرایمر در رونویس معکوس استفاده شد. واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه جهت سنتز cDNA و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم انجام گرفت. مواد لازم برای سنتز cDNA، شامل ۱ میکرو لیتر Random Hegzamer، ۱ میکرو لیتر پرایمر Oligi dT، ۱ میکرو لیتر dNTP، ۵ میکرو لیتر RNA، ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم MMULV، ۲ میکرو لیتر MMULV Buffer و ۹/۵ میکرو لیتر DEPC به هر میکرو تیوب افزوده شد، به‌طوری‌که حجم نهایی واکنش درنهایت ۲۰ میکرو لیتر شد. پس از تهیه cDNA، میزان بیان ژن PTEN به‌عنوان ژن هدف در هر دو گروه مورد و شاهد و ژن β-Actin به‌عنوان ژن مرجع توسط Real-Time PCR (ABI 7300) موردبررسی قرار گرفت. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار

Perl primerنسخه ۲۰ انجام شد. مشخصات پرایمرهای به‌کاررفته در این پژوهش در جدول ۱ آورده شده است.
دمای اصلی برای هر دو ژن PTEN و β-Actin دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. تائید اختصاصی بودن عملکرد پرایمرهای طراحی‌شده و نیز عدم آلودگی به DNA ژنومی، با بررسی پیک منحنی ذوب اختصاصی در دمای ۹۰ و ۹۱ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب برای PTEN و β-Actin) انجام پذیرفت (نمودار ۱ و ۲). تفاوت بیان ژن PTEN در افراد سالم و بیمار نیز در نمودار ۳ نمایش داده‌شده است. به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مذکور در هر دو گروه مورد و شاهد، محلول نهایی واکنش در حجم نهایی ۲۰ µL تهیه شد (جدول ۲).

سیکل دمایی به‌کاررفته شامل یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت فعال‌سازی آنزیم پلیمراز، در ادامه ۴۰ سیکل هر یک شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. واکنش‌ها به‌صورت سه‌تایی به همراه یک واکنش بدون الگو برای هر ژن در پلیت ۹۶ چاهکی انجام گرفت.
به‌منظور بررسی میزان بیان ژن از مقایسه میانگین Ct (چرخه آستانه) در سه بار تکرار استفاده شد. مقایسه میزان بیان ژن در دو گروه مورد و شاهد بر مبنای آزمون آماری تی برای دو گروه مستقل با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد که در آن مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی و خصوصیات پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن اصلی و ژن مرجع

نام ژن	پرایمر	توالی پرایمر (5′→3)	طول پرایمر (bp)	%CG	Tm (C°)
PTEN	Forward	AGCGTGCAGATAATGACAAGG	۲۱	۴۸	۵۹٫۵
	Reverse	AGAGGAGCCGTCAAATCCAG	۲۰	۵۵	۶۰٫۵
β-actin	Forward	TGGCACCCAGCACAATGAAG	۲۰	۵۵	۶۰٫۵
	Reverse	GAAGTGTGACGTGGACATCC	۲۰	۵۵	۶۰٫۵

جدول ۲: حجم و غلظت مواد به‌کاررفته در Real-time PCR

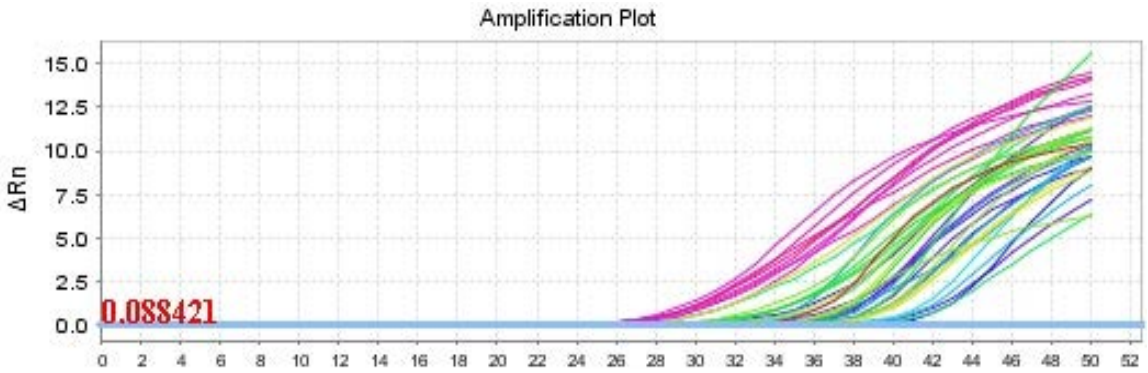
ماده	حجم (µL)
SYBER Green (primer design)	۱۰
ddH_2O	۷
Forward Primer	۰٫۵
Reverse Primer	۰٫۵
cDNA	۲
حجم نهایی	۲۰

یافته‌ها:

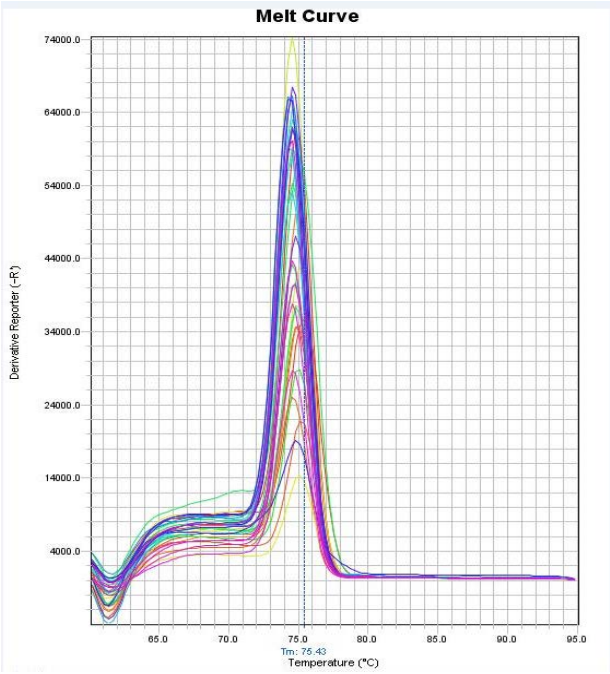
محدوده سنی بیماران بین ۳۲ تا ۷۴ سال با میانگین سنی و انحراف استاندارد ۹/۸۱ ± ۵۳ سال و محدوده سنی افراد سالم بین ۳۱ تا ۷۸ سال با میانگین سنی و انحراف استاندارد ۱۰/۰۳ ± ۵۴/۵ بود. یافته‌های به‌دست‌آمده از سنجش کیفیت RNA با استفاده از تکنیک اسپکتوفتومتر حاکی از کیفیت مطلوب RNA بود. میانگین OD به‌دست‌آمده در طول‌موج ۲۸۰/۲۶۰ بین ۱/۷۹ تا ۲/۱ بود که حاکی از کیفیت مناسب و نیز عدم آلودگی RNA استخراج‌شده به DNA و پروتئین است. بااین‌حال، به‌منظور حصول اطمینان از عدم آلودگی، الکتروفورز RNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۲٪ انجام گرفت که عدم مشاهده باندهای DNA در بالای ژل تائید کننده کیفیت RNA بود (تصویر ۱). پس از حصول اطمینان از کیفیت RNA استخراج‌شده و نیز کار آیی پرایمرهای طراحی‌شده، میزان بیان ژن PTEN در گروه افراد مبتلابه آنکیلوزان اسپوندیلیت و مقایسه آن با گروه افراد سالم بررسی شد. به‌منظور مقایسه میانگین بیان ژن PTEN بین گروه‌های موردمطالعه از آزمون تی مستقل استفاده شد. مقادیر به‌صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده‌شده است (جدول ۲). نتایج به‌دست‌آمده حاکی از کاهش میزان بیان ژن PTEN در گروه افراد مبتلابه آنکیلوزان اسپوندیلیت در مقایسه با افرد سالم است (P=۰/۰۲).

جدول ۲: مقایسه بیان ژن PTEN در افراد بیمار و سالم

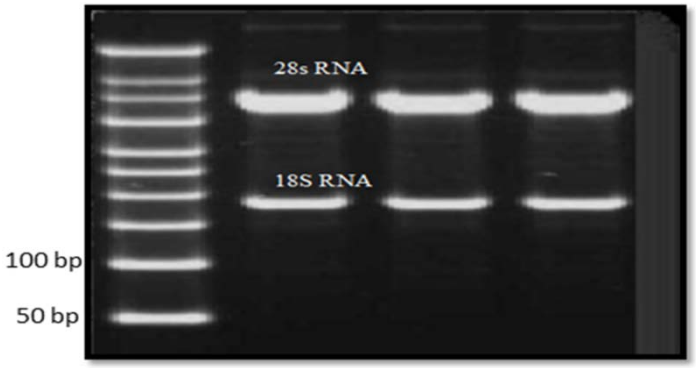
ژن	افراد بیماران		افراد سالم		P value
	میانگین	انحراف استاندارد	میانگین	انحراف استاندارد	
PTEN	۰/۶۱۲	۰/۰۵۵	۰/۹۲۷	۰/۱۵۸	۰/۰۲



نمودار ۱: منحنی تکثیر ژنPTEN



نمودار ۲: منحنی ذوب ژن PTEN



تصویر ۱:RNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۲٪

بحث و نتیجه‌گیری:

یافته‌های به‌دست‌آمده حاکی از نقش کلیدی انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب گر تومور در مسیرهای تنظیمی تقسیم سلولی است [۱۱]. بر این اساس فعال شدن انکوژن ها و یا غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب گر تومور می‌تواند منجر به رشد غیرقابل‌برگشت و کنترل نشده سلول‌ها شود. از سوی دیگر، رشد سلول‌ها نه تنها به فاکتورهای رشد، بلکه به اتصال سلول‌ها به ماتریکس خارج سلولی توسط اینتگرین ها وابسته است [۱۲]. اینتگرین‌ها، پروتئین‌های سطح سلولی هستند که در اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی نقشی حیاتی ایفا می‌کنند. از سوی دیگر اینتگرین‌ها می‌توانند سبب فرستاده شدن پیام‌ها به درون سلول‌ها شده و بدین ترتیب موجب تنظیم ریخت‌زایی و تنظیم چرخه سلولی شوند [۱۳].

با توجه به نقش اینتگرین‌ها به‌عنوان عوامل تنظیم‌کننده رشد، حرکت سلولی و نیز نوآرایی بافتی، بررسی عوامل مؤثر در تنظیم فعالیت آن‌ها به‌منظور شناسایی بیولوژی و سازوکار حاکم بر بروز بسیاری از سرطان‌ها و بیماری‌های خود ایمنی از اهمیت قابل‌توجه ای برخوردار است [۱۴]. بر اساس شواهد به‌دست‌آمده، ژن PTEN یکی از مهم‌ترین ژن‌های شناخته‌شده سرکوب گر تومور بوده که نقشی کلیدی در تنظیم مهاری اینتگرین‌ها ایفا می‌کند [۱۵]. این ژن، کد کننده پروتئینی با خاصیت کاتالیزوری تیروزین فسفاتازی است که می‌تواند مولکول PIP3 (Phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate) که لیپید انتقال‌دهنده پیام است را دفسفریله کند [۱۶]. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، این آنزیم به‌واسطه فعالیت فسفاتازی خود، نقشی مهم در بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ حیاتی همچون تنظیم چرخه سلولی، مهاجرت سلولی، آپوپتوز و رگ زایی ایفا می‌کند [۱۷]. ازاین‌رو نقش سرکوب گری تومور برای این ژن فرض می‌شود [۱۸]. نتایج مطالعه‌های انجام‌شده حاکی از ارتباط میان موتاسیون های ژرمینال ژن PTEN و خطر ابتلا به سرطان تیروئید می‌باشد. علاوه بر این، دخالت موتاسیون های سوماتیک PTEN در بروز برخی سرطان‌ها همچون سرطان سینه، سرطان لوله گوارش، پروستات، تخمدان و آندومتریوم نیز گزارش‌شده است [۱۹].

از سوی دیگر، با توجه به نقش محصول پروتئینی ژن PTEN به‌عنوان یک فسفاتاز با نقش کلیدی در تنظیم چرخه سلولی، می‌توان از آن به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید مرتبط با بروز بیماری‌های خود ایمنی همچون آنکیلوزان اسپوندیلیت نام برد. به‌منظور تائید این فرضیه، تاکنون مطالعه‌های محدودی انجام پذیرفته است که ازجمله نخستین پژوهش‌های انجام‌شده می‌توان به مطالعه کریستافانو و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی مدل حیوانی اشاره کرد. یافته‌ها نشان داد که پروتئین کد شده توسط ژن PTEN به‌عنوان یک میانجی ضروری در فرآیند آپوپتوز از یک‌سو و یک مهارکننده خود ایمنی از سوی دیگر، نقش مهمی ایفا می‌کند. بر این اساس، ژنوتیپ هتروزیگوت این ژن (Pten +/−) می‌تواند به‌واسطه اختلال در فرآیند آپوپتوز و نیز کاهش میزان فعالیت لنفوسیت‌های T، منجر به بروز نقص‌های ایمنی پلی کلونال کشنده در موش‌های حامل این ژنوتیپ شود [۲۰].

در ادامه این پژوهش‌ها، رایت و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی میزان مونوسیت های خون محیطی بیماران مبتلابه اسپوندیلیت انکیلوزان و مقایسه آن با بیماران مبتلابه آرتریت روماتوئید و افراد سالم پرداختند. در این پژوهش، میزان بیان مونوسیت های خون محیطی در سه گروه موردمطالعه با استفاده از روش الکتروفورز دوبعدی اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از افزایش میزان بیان ترکیبات پروتئوزوم همچون زیر واحد β فعال پروتئوزوم در بیماران مبتلابه اسپوندیلیت انکیلوزان بود. همچنین بروز تغییرات قابل‌ملاحظه در بیان مونوسیت ها تنها در بیماران مبتلابه اسپوندیلیت انکیلوزان مشاهده شد. از سوی دیگر، میزان بیان پروتئین‌های مرتبط با فعالیت لکوسیت ها، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، اینتگرین و نیز پروتئین‌های شناخته‌شده در مسیرهای پیام‌رسان سیستم ایمنی همچون Toll-like receptors، در بیماران

مبتلابه اسپوندیلیت انکیلوزان و آرتریت روماتوئید در مقایسه با افراد سالم به‌طور معناداری تغییر داشت. نتایج به‌دست‌آمده از پروتئومیکس انجام‌شده در این پژوهش، به‌روشنی بیانگر نقش کلیدی مونوسیت ها در بیماری‌زایی اسپوندیلیت انکیلوزان و آرتریت روماتوئید بود [۲۱].

لیو و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی نقش لنفوسیت‌های T در بروز بیماری‌های خود ایمنی در مدل حیوانی پرداختند. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که نقص عملکردی ژن PTEN به‌عنوان یک انکوژن، نقشی کلیدی در زایش سلول‌های لنفوسیتی غده تیموس ایفا می‌کند. با توجه به نقش غده تیمور به‌عنوان یک اندام تخصص‌یافته در دستگاه ایمنی بدن که تنها فعالیت شناخته برای آن تبدیل لنفوسیت‌های T نابالغ به بالغ است، نتایج به‌دست‌آمده از اهمیت به سزایی برخوردار بود [۲۲].

در سال ۲۰۱۲، بلوم و همکاران به دلیل اهمیت سلول‌های استئوکلاست ها در بروز بیماری‌های سیستماتیک مرتبط با تحلیل بافت استخوانی همچون آنکیلوزان اسپوندیلیت، به بررسی عوامل و مسیرهای تنظیم‌کننده رشد این سلول‌ها پرداختند. در این مطالعه نقش کمپلکس PI3-Kinase/PTEN در فرآیند زایش و تولید سلول‌های استئوکلاست موردبررسی قرار گرفت. یافته‌ها حاکی از آن بود که PTEN به‌عنوان یک لیپید فسفاتاز، نقشی کلیدی در سرکوب فعالیت‌های بیولوژیکی PI3-Kinase ایفا می‌کند. بر این اساس، رشد سلول‌های استئوکلاست در موش‌های مبتلابه نقص در سیستم ماکروفاژی (Pten −/−) در مقایسه با موش‌های وحشی به میزان قابل‌ملاحظه‌ای کاهش داشته است. این نتایج به‌وضوح بیانگر نقش PTEN در فرآیند زایش سلول‌های استئوکلاست در مدل حیوانی بود. به‌عبارت‌دیگر، هرگونه تغییر در میزان فعالیت PI3-Kinase به‌واسطه نقص در ساختار PTEN می‌تواند به تخریب سلول‌های بافت مغز استخوان منجر شود [۲۳].

نتایج پژوهش‌های انجام‌یافته در سال‌های اخیر به‌وضوح حاکی از نقش PTEN در تنظیم فرآیندهای حیاتی سلول همچون رشد، متابولیسم و بقاء سلولی [۲۴] و همچنین در جلوگیری از بروز خود ایمنی ذاتی و نیز ممانعت از بروز بدخیمی در سلول‌های لنفوسیت T تائید شده است. ازاین‌رو، بروز هرگونه جهش اعم از جهش‌های سوماتیک و یا جهش در ژرمینال می‌تواند منجر به بروز نقص‌های خود ایمنی شود [۲۵].

باوجود نتایج ارزشمند به‌دست‌آمده در خصوص نقش عوامل مؤثر بر بروز بیماری‌های خود ایمنی همچون آنکیلوزان اسپوندیلیت، انجام پژوهش‌های گسترده‌تر به‌منظور تعیین دقیق عوامل خطر ابتلا به بیماری از یک‌سو و شناسایی مسیرهای بیولوژیک مرتبط با بیماری‌زایی بیماری از سوی دیگر، از اهمیت بسزایی برخوردار است. شناسایی عوامل ذکرشده می‌تواند نقشی تأثیرگذار درروند تشخیص زودهنگام بیماری در افراد مستعد و دست‌یابی به روش‌های درمانی هر چه مؤثرتر ایفا کند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر به بررسی میزان بیان ژن PTEN به‌عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین ژن‌های پروتوانکوژن مرتبط با کنترل رشد و تکثیر سلول‌ها، در دو گروه بیماران مبتلابه آنکیلوزان اسپوندیلیت و افراد سالم پرداخته است. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از کاهش میزان قابل‌ملاحظه بیان این ژن در بیماران مبتلا در مقایسه با افراد سالم است. ازاین‌رو، می‌توان از شاخصه میزان بیان ژن PTEN به‌عنوان یک پارامتر بالینی در غربالگری اولیه افراد دارای ریسک ابتلا به آنکیلوزان اسپوندیلیت استفاده کرد.

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مبتنی بر حجم نمونه‌ای معادل ۱۰۰ شرکت‌کننده در دو گروه مورد و شاهد بوده است و اگرچه این امر می‌تواند از قدرت تعمیم نتایج آن بکاهد، بااین‌حال بر مبنای شواهد موجود، پژوهش حاضر نخستین مطالعه انجام‌یافته در این زمینه در جمعیت ایرانی بشمار می‌رود. ازاین‌رو می‌توان از یافته‌های به‌دست‌آمده به‌عنوان سرآغازی جهت انجام مطالعات گسترده‌تر آتی بهره جست.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه مصوب در مقطع کارشناسی ارشد است. بدین‌وسیله از تمام بیماران و کارکنان بخش روماتولوژی بیمارستان شهدای تجریش که در اجرای این پژوهش همکاری داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض و منافع:

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References:

1. Wanders A, Heijde Dvd, Landewé R, et al. Nonsteroidal anti inflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. Arthritis Rheum 2005; 52(6): 1756-65.
2. Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, et al. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. Ann Rheum Dis 2012; 71(10): 1616-22.

3. Prajzlerová K, Grobelná K, Hušáková M, et al., Association between circulating miRNAs and spinal involvement in patients with axial spondyloarthritis. PLoS One 2017; 12(9): 0185323.
4. Danve A, O'Dell J. The ongoing quest for biomarkers in Ankylosing Spondylitis. Int J Rheum Dis 2015;18(8):826-34.
5. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, et al. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. Arthritis Rheum 2012;64(5):1388-98.
6. Canbaz D, Utsch L, Logiantara A, et al. IL-33 promotes the induction of immunoglobulin production after inhalation of house dust mite extract in mice. Allergy 2015;70(5):522–32.
7. Ma XF, Wang XD, Liu RR, et al. Efficacy research of salazosulfamide in ankylosing spondylitis and NAT1 gene polymorphism. Exp Ther Med 2017 ;14(4):2999-3003.
8. Bartolomé N, Szczypiorska M, Sánchez A, et al. Genetic polymorphisms inside and outside the MHC improve prediction of AS radiographic severity in addition to clinical variables. Rheumatology 2012; 51(8): 1471-8.
9.Ward MM, Weisman MH, Davis JC, et al. Risk factors for functional limitations in patients with long-standing ankylosing spondylitis. Arthritis Care Res 2005; 53(5): 710-7.
10. Haroon N, Kim T-H, Inman RD. NSAIDs and radiographic progression in ankylosing spondylitis Bagging big game with small arms? Ann Rheum Dis 2012; 71(10): 1593-5.
11. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. Cell 1991; 64(2): 235-48.
12. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. Curr Opin Cell Biol 1997; 9(5):701-6.
independence. J Cell Biology 1997; 139(3): 575-8.
14. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. Science 1999; 285(5430): 1028-33.
15. Tamura M, Gu J, Tran H, et al. PTEN gene and integrin signaling in cancer. J Nation Cancer Inst 1999;91(21): 1820-8.
16. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. J Biol Chem 1998; 273(22): 13375-8.
17. Mulholland DJ, Tran LM, Li Y, et al. Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth. Cancer Cell 2011; 19(6): 792-804.
18. Li D-M, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor β. Cancer Res 1997; 57(11): 2124-9.
19. Kong D, Suzuki A, Zou T-T, et al. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. Nat Genet 1997; 17(2): 143-4.
20. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, et al. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/− mice. Science 1999; 285(5436): 2122-5.
21. Wright C, Edelmann M, Kollnberger S, et al. Ankylosing spondylitis monocytes show upregulation of proteins involved in inflammation and the ubiquitin proteasome pathway. Ann Rheum Dis 2009; 68(10): 1626-32.
22. Liu X, Karnell JL, Yin B, et al. Distinct roles for PTEN in prevention of T cell lymphoma and autoimmunity in mice. J Clin Invest 2010; 120(7): 2497-507.
23. Blüml S, Friedrich M, Lohmeyer T, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN) in myeloid cells controls inflammatory bone destruction by regulating the osteoclastogenic potential of myeloid cells. Annals of the rheumatic diseases 2013: Ann Rheum Dis 2015; 74(1): 227-33.
24. Baker SJ. PTEN enters the nuclear age. Cell 2007;128(1):25-8.
25. Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. Cell 2007; 130(1): 25-35.

Original Article

PTEN Gene Expression in Patients with Ankylosing Spondylitis

Seyed Mohammad Taheri [1], Khadijeh Onsory [*1], Vahid Shariati [2]

Received: 2017/28/12 Revised: 2018/25/02 Accepted: 2018/7/03

1. Biology Dept, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
2. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehren, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.15, No.4, Winter 2018

Pars J Med Sci 2018; 15(4):21-28

Abstract:

Introduction:
Ankylosing spondylitis (AS), the most common form of spondyloarthropathy, is a chronic, progressive multi-system inflammatory disorder characteristically affecting the sacroiliac joints and axial skeleton. The protein encoded by the PTEN gene which has a phosphatase activity, plays a key role in many of the signaling pathways, such as cell cycle regulation, cell migration, apoptosis and angiogenesis. The aim of this study was to evaluate the expression of PTEN gene in patients with AS and compare it to that of healthy individuals in Iranian population.

Material and Methods:
The present case-control study enrolled 50 patients with AS and 50 healthy controls from those presenting to Shohada Hospital, Tajrish, Tehran in 2015. RNA was extracted from peripheral blood leukocytes and subsequently PTEN gene expression was investigated in both groups using Real-time PCR. Statistical analysis was performed in SPSS (version 19) and Graphpad prism 6 using independent t-test. $P<0.05$ was considered significant.

Results:
The results showed that PTEN expression was significantly decreased in patients compared to the control group ($P=0.02$).

Conclusion:
PTEN gene expression can be considered as a parameter for screening and early diagnosis of individuals susceptible to this disease.

Keywords: Ankylosing spondylitis, PTEN gene, Real Time PCR

* Corresponding author Email: onsory@gmail.com