

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن ABCB11 با بروز سنگ کیسه صفرا و فاکتورهای بیوشیمیایی SGPT، SGOT مرتبط با آن در جمعیت ایرانی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۸/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: ژن ABCB11 بر روی کروموزوم ۲ و با احتمال تشکیل سنگ کیسه صفرا، پمپ خروج نمک صفراوی (BSEP) را در انسان رمزگذاری می کند. هدف پژوهش حاضر بررسی ارتباط فاکتورهای بیوشیمیایی کبدی و پلی مورفیسم ژن ABCB11 با خطر تشکیل سنگ کیسه صفرا است.

مواد و روش‌ها: مطالعه بر روی ۱۰۰ بیمار سنگ کیسه صفرا و ۱۰۰ فرد سالم در بیمارستان گلزار رشت، سال ۱۳۹۷ انجام گرفت. پس از سونوگرافی، افراد به دو گروه بیمار و سالم تقسیم و رابطه بیماری و پلی مورفیسم ژن ABCB11 توسط ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. به طور تصادفی ۱۰ درصد نمونه ها برای تایید نتایج مورد توالی یابی قرار گرفتند. تفاوت بین دو گروه با تجزیه و تحلیل آماری انجام شد.

یافته ها: در مطالعه حاضر میانگین SGOT، SGPT بیماران در مقایسه با افراد سالم افزایش نشان داد ($P < 0.05$). فراوانی آلل C ژن ABCB11 بین بیمار و سالم به ترتیب ۲۲/۵ و ۲۲ درصد بود. نسبت فراوانی آلل ها و ژنوتیپ ها در بیماران در مقایسه با سالم ارتباط معنادار نداشت ($P > 0.05$). با این حال، فراوانی ژنوتیپ های TC، TT و CC در بین افراد بالای ۶۰ سال به ترتیب ۲۷، ۲۱ و ۳ بود. بین جنسیت و سن با بیماری ارتباط معنادار وجود نداشت ($P > 0.05$). میانگین سن افراد بیمار بالای ۶۰ سال ($P = 0.0$) به طور معناداری بیش از سالم بود.

نتیجه گیری: افزایش فاکتورهای بیوشیمیایی در بیماران می تواند وجود آسیب کبدی را پیش بینی کند.

واژگان کلیدی: بیماری سنگ کیسه صفرا، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ABCB11، کله لیتیاژیس

صدیقه یکتا مقدم^۱، دکتر مجتبی فتحی^{۲،۳*}، دکتر محمد مهدی فرقانی فرد^۱، دکتر وجیهه زرین پور^۱

^۱ گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
^۲ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده بیماری های غیر واگیر دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
^۳ دپارتمان بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

نویسنده مسئول:

دانشیار، دپارتمان بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

صندوق پستی: ۳۴۱۹۹۱۵۳۱۵

+ Tel ۹۸۲۸۳۳۳۶۰۰

E-mail: m.fathi@qums.ac.ir

مقدمه

جهت بررسی SNP rs2287622 در اگزون ۱۳ ژن ABCB11 که مهمترین SNP این ژن می باشد از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد.

مواد و روش ها

بیماران

مطالعه حاضر بر روی بیماران مبتلا به سنگ کیسه صفرا در شمال ایران (رشت) انجام شد. بر اساس جدول استاندارد مورگان، ۱۰۰ بیمار مبتلا به سنگ کیسه صفرا (۶۹ زن و ۳۱ مرد) انتخاب گردید. پس از تشخیص علایم بیماری سنگ کیسه صفرا و ۱۰۰ داوطلب سالم (۷۰ زن و ۳۰ مرد) با جنس و سن مشابه بیماران بدون علایم این بیماری به عنوان نمونه شاهد انتخاب شدند. نمونه گیری از فروردین سال ۱۳۹۷ تا شهریور سال ۱۳۹۷ انجام گرفت. کلیه افراد مورد مطالعه، با رضایت آگاهانه کتبی جهت شرکت در این طرح موافقت نموده و پروتکل توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد دامغان تأیید گردید (IR.IAU.DAMGHAN.REC.1398.006). سن افراد مورد مطالعه بین ۲۱ تا ۸۵ سال بود و افراد خارج از این رنج سنی، به عنوان معیار خروج از مطالعه در نظر گرفته شد. ۲ میلی لیتر نمونه خون محیطی افراد مورد مطالعه در لوله های CBC جمع آوری و پیش از استخراج DNA در یخچال با دمای منفی ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه خون در لوله های حاوی EDTA با استفاده از پروتکل بر پایه کلروفرم انجام شد. بر اساس پروتکل استاندارد، DNA ژنومی از خون بیماران استخراج شد. DNA ژنومی با استفاده از کیت (Lot: 15f20_06) از خون استخراج گردید.

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر (Pharmacia Biotech GeneQuant II) و در الکتروفورز ژل آگارز ادرصد (با اضافه کردن رنگ ژل رد) مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعه ژنتیکی

پلی مورفیسم ها بر اساس داده های تهیه شده در پایگاه مرکز ملی اطلاعات داده های بیوتکنولوژی SNP

سنگ های صفراوی، توده هایی در کیسه صفرا یا مجاری صفراوی هستند که در اثر افزایش کلسترول یا بیلی روبین در صفرا ایجاد می شوند. سنگ کیسه صفرا بسیار متداول است (حدود ۱۰-۲۰ درصد از جمعیت بالغ جهان) و بیش از ۲۰ درصد از افراد مبتلا به سنگ کیسه صفرا علائم واضحی از این بیماری را در طول زندگی، معمولاً در بزرگسالی (کولیک یا عفونت صفراوی) نشان می دهند.

بیماری سنگ کیسه صفرا با بروز علائم یا عوارضی در کیسه صفرا یا مجاری صفراوی مشخص می شود. بیماری سنگ کیسه صفرا بالاترین هزینه های اقتصادی و اجتماعی را در بین بیماری های دستگاه گوارش دارد.^۱ در اروپا، حدود ۲۰ درصد از جمعیت بالغ دارای سنگ های صفراوی می باشند.^۲ شیوع این بیماری با افزایش سن (مردان و زنان در سنین ۵۰ تا ۶۰ سال) افزایش می یابد، شیوع بیماری سنگ کیسه صفرا در سالمندان نشان دهنده اهمیت این بیماری در سراسر جهان است. علاوه بر این، شیوع این بیماری در زنان بیشتر از مردان است.^۳ از نظر تاریخی، کمترین شیوع سنگ کیسه صفرا در جمعیت های آفریقایی گزارش شده است که میانگین شیوع این بیماری در جمعیت های آسیایی (۵-۲۰ درصد) است. در جمعیت هایی که شیوع کمی از این بیماری دارند، این بیماری با افزایش مصرف غذاهای پر کالری (کربوهیدرات زیاد و فیبر کم) و همچنین کاهش فعالیت بدنی افزایش یافته است.^{۴،۵} در جمعیت ایران سنگ های کیسه صفرا در میانسالی بسیار کم، اما در پیری به سرعت رشد می کنند. در حالی که این افزایش به میزان رشد در جمعیت غربی نمی رسد.^۶ در مطالعه ای بر روی جمعیت ایرانی، سنگ کیسه صفرا در ۲۰ مورد (۶/۷ درصد) گزارش شده است. سنگ کیسه صفرا منجر به عوارضی از جمله کولسیستیت حاد، پانکراتیت، کولانژیت و زردی می شود.^۷

فاکتورهای خطر ابتلا به بیماری سنگ کیسه صفرا شامل سن، جنسیت زن، نژاد و چاقی است.^۸ علاوه بر فاکتورهای خطر ذکر شده، نقش عوامل ژنتیکی در مستعد کردن افراد به سنگ کیسه صفرا از اهمیت برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژن ABCB11 و آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی مرتبط با آن (SGPT و SGOT) در افراد مبتلا به سنگ کیسه صفرا می باشد. بدین منظور

مورفیسم ABCB11 استفاده گردید. پرایمرها جهت ARMS-PCR
تحلیل قرار گرفت. از روش ARMS-PCR جهت غربالگری پلی
مورفیسم ABCB11 استفاده گردید. پرایمرها جهت ARMS-PCR
به شرح زیر می باشد:

Table1. Primer sequences for ABCB11 and ARMS-PCR analysis.

Sequences	Product size
Wild-type Primer	174 bp
Forward primer: TCTAAATGACCTCAACATGGT	
Reverse primer: TTTGCACTTTACTGTCCCCA	
Mutant Primer	236 bp
Forward primer: TGCCAAAACCTCATCCTTGC	
Reverse primer: TCATTTCCCCTGGTTTAATGG	

ABCB11; ATP-binding cassette, sub-family B member 11, ARMS-PCR;
amplification-refractory mutation system polymerase chain reaction, bp; base pair.

تکنیک ARMS-PCR

در این تحقیق برای بررسی SNP (rs2287622) ژن ABCB11 از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و با برنامه حرارتی ۹۵ درجه سانتی گراد جهت واسرشت اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی گراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن نرمال ABCB11 و دمای ۶۵/۵ درجه سانتی گراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن موتانت ABCB11، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بسط آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه و به تعداد ۳۳ سیکل انجام شد. بررسی صحت قطعه بدست آمده محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. صحت انجام واکنش پلی مرایی با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و مشاهده باند تکثیر شده با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد تایید قرار گرفته و محصول برای انجام چند شکلی قطعات طولی محدود PCR مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام PCR

قطعات از لحاظ طول باند، در ژل آگارز یک درصد در کنار مارکر ۱۰۰ bp مورد الکتروفورز قرار گرفت و در نهایت با نور UV مشاهده شد.

تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها در این مطالعه از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شده است. در تحلیل توصیفی فراوانی، درصد فراوانی و شاخص مرکزی از نظر آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

براساس نتایج این مطالعه، فراوانی زنان (۶۹٪) و مردان با کیسه صفرا (۳۱٪) در بین بیماران بود. بیشترین فراوانی در زنان با ژنوتیپ TT (۸۵٪) و کمترین فراوانی در زنان با ژنوتیپ CC (۴٪) مشاهده شد. بیشترین فراوانی (۵۱٪) مثانه کیسه صفرا در بیماران بالای ۶۰ سال و کمترین (۴۹٪) فراوانی کیسه صفرا در بیماران زیر ۶۰ سال است. بیشترین فراوانی ژنوتیپ ها (CC، TC، TT) در

نتایج نشان داد که ۳ الگوی ژنوتیپی در نمونه های مورد مطالعه وجود دارد. فراوانی الگوهای ژنوتیپی و آللی در زیر ارائه شده است. برای تأیید وجود یا عدم وجود جهش های مورد نظر، محصولات PCR توالی شدند و برای توالی به هر یک از SNP ها ارسال شدند.

بحث

SNP ما در این مطالعه تجزیه و تحلیل rs2287622 ارتباط معنی داری با تشکیل سنگ کیسه صفرا نشان نمی دهد. سنگ کیسه صفرا یکی از شایع ترین بیماری ها با نرخ ۱۰٪-۲۰٪ در کشورهای توسعه یافته است^۹. شیوع کلی در آسیا پایین تر است: از ۳ تا ۱۵ درصد^{۱۰}. این تفاوت ممکن است مربوط به قومیت ها و عوامل ژنتیکی باشد که قبلاً مورد بحث قرار گرفته است. در مطالعات قبلی در آسیا، حساسیت به سنگ صفرا بین قومیت ها و شیوع برخلاف مطالعه ما متفاوت بود، در مردان بیشتر بود^{۱۱}. بسیاری از جزئیات ژنتیکی ممکن است در معرض ابتلا به بیماری اختلال ایجاد کند^{۱۲}. در سن مطالعه ما با آنالیز تست های مجذور کای با بیماری سنگ صفرا همراه نبود ($P=0/29$). برخلاف مطالعه ما، ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان می دهند که روند پیری ترشح کبدی کلسترول را افزایش داده و سنتز اسیدهای صفراوی را کاهش می دهد. سوپر اشباع صفراوی متعاقب آن با کلسترول می تواند خطر پیدایش سنگ کیسه صفرا را با افزایش سن افزایش دهد^{۱۳}.

نتیجه گیری

تولید صفرا یک عملکرد مهم کبد است. نقص آن می تواند در اثر جهش های ارثی و یا توسط عوامل اکتسابی ایجاد شده و منجر به کلستاز شود. اختلافات بین یافته های ما و سایر مطالعات با تفکیک قومیت به وجود آمده است. علاوه بر این، ما پیشنهاد می کنیم که این یافته ها در یک مطالعه کوهورت بزرگ تأیید شود.

افراد زیر ۶۰ سال (۶۸/۵٪) و کمترین فراوانی ژنوتیپ (TC، TT، CC) در افراد بالای ۶۰ سال (۳۱/۵٪) مشاهده شد. فراوانی ژنوتیپ (۶۰٪) TT و ژنوتیپ (۴/۴٪) CC در بین افراد (۲۰۰ مورد) مشاهده شد. بیشترین فراوانی ژنوتیپ (۳۰٪) TT و کمترین فراوانی ژنوتیپ (۲۵/۲٪) CC مشاهده شد. از نظر جنسیت بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p=0/87$). در حالی که از نظر سن ($p=0/0$)، سطح آنزیم SGOT ($p=0/02$)، سطح آنزیم SGPT ($p=0/03$)، بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود داشت. ژنوتیپ و جنسیت ($p=0/24$)، سن ($p=0/29$)، سطح آنزیمی SGOT ($p=0/88$)، SGPT ($p=0/36$)، اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین بین ژنوتیپ ها و بیماری تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p=0/93$).

براساس رابطه بین متغیرهای بیوشیمیایی SGOT ($P=0/17$) و جنسیت ($P=0/11$)، SGPT و جنسیت (۳۰ نفر) تفاوت معنی داری نداشتند. زنان و مردان در زنان مورد مطالعه قرار گرفتند. با توجه به جدول که نشان دهنده فراوانی آلل های طبیعی و جهش یافته در بیشترین فراوانی آلل (T) در افراد طبیعی (۷۸٪) و کمترین فراوانی آلل (C) در افراد طبیعی (۲۲٪) مشاهده شد. فراوانی بین آلل های طبیعی و جهش یافته به طور معنی داری مشاهده نشد. بین آزمودنی ها تفاوت معنی داری وجود دارد ($p=0/9$).

تصویر الکتروفورز Rs2287622 ژن ABCB11: ستون A نشانگر ۱۰۰ bp را نشان می دهد. ستون خالی B (محصول PCR بدون DNA). ستون های C و D حالت جهش یافته rs2287622 (236bp)، طبیعی ۱۷۴ bp، E و F و ستون G خالی را روی ژل آگارز ۱٪ نشان می دهند. ژنوتیپ های افراد مورد آزمایش با استفاده از مدل ارائه شده با رنگ آمیزی ژل آگارز تعیین شد. نمونه پژوهش شامل ۲۰۰ نفر بود.

References

1. Everhart, J. E. & Ruhl, C. E. Burden of digestive diseases in the United States Part III: liver, biliary tract, and pancreas. *Gastroenterology* 2009; 136, 1134–1144.
2. Aerts, R. & Penninckx, F. The burden of gallstone disease in Europe. *Aliment. Pharmacol* 2001; Ther. 18 (Suppl. 3), 49–53.
3. Volzke, H. et al. Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence. *Digestion* 2005; 71, 97–105.
4. Carey, M. C. & Paigen, B. Epidemiology of the American Indians' burden and its likely genetic origins. *Hepatology* 2002. 36, 781–791.
5. Nervi, F., Miquel, J. F. & Marshall, G. The Amerindian epidemics of cholesterol gallstones: the North and South connection. *Hepatology* 2003; 37, 947–948.
6. Tsai, C. J., Leitzmann, M. F., Willett, W. C. & Giovannucci, E. L. Macronutrients and insulin resistance in cholesterol gallstone disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2008; 103, 2932–2939.
7. Goto K, Sugiyama K, Sugiura T, Ando T, Mizutani F, Terabe K, et al. Bile salt export pump gene mutations in two Japanese patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36: 647-650.
8. Clemens Schafmayer, Jürgen Hartleb, Jürgen Tepe, Stefan Albers, Sandra Freitag, Henry Völzke, Stephan Buch, Markus Seeger, Birgit Timm, Bernd Kremer, Ulrich R Fölsch, Fred Fändrich, Michael Krawczak, Stefan Schreiber and Jochen Hampe. Predictors of gallstone composition in 1025 symptomatic gallstones from Northern Germany. *BMC Gastroenterology* 2006, 6:36.
9. Liqing Yu, Jia Li-Hawkins, Robert E. Hammer, Knut E. Berge, Jay D. Horton, Jonathan C. Cohen and Helen H. Hobbs. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J. Clin. Invest.* 110:671–680 (2002).
10. Peter I. Mackenzie, Karl Walter Bock, Brian Burchell, Chantal Guillemette, Shin-ichi Ikushiro, Takashi Iyanagi, John O. Miners, Ida S. Owens and Daniel W. Nebert . Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005, 15:677–685.
11. Bahram Amouoghlat Berrizi, Siamand Ancient, Shirkooh Abbasi Hajiabad, Mohammad Moradian. Frequency of biliary stones in slaughter buffaloes in Tabriz slaughter house and its relation with Some liver parameters. Volume 9, Issue 1, Year 33, Spring 13.
12. P DUVALDESTIN, J-L MAHU, J-M METREAU, JOSETTE ARONDEL, ANNE-MARIE PREAUX, AND P BERTHELOT. Possible role of a defect in hepatic bilirubin glucuronidation in the initiation of cholesterol Gallstones. *Gut* 1980, 21, 650-655.
13. Schafmayer, C. et al. Predictors of gallstone composition in 1025 symptomatic gallstones from Northern Germany. *BMC Gastroenterol.* 2006; 6, 36.

Sedigheh Yektamoghaddam¹,
Mojtaba Fathi^{2,3*}, Mohammad
Mahdi Forghanifard¹, Vajiheh
Zarrinpour¹

¹Department of Biology,
Damghan Branch, Islamic
Azad University, Damghan,
Iran.

²Professor, Institute for Non-
Communicable Diseases,
Cellular and Molecular
Research Center, Qazvin
university of Medical
Sciences, Qazvin, Iran.

³Department of Biochemistry
and Genetics, School of
Medicine, Qazvin university
of Medical Sciences, Qazvin,
Iran

Evaluation of the relationship between ABCB11 gene polymorphism and the incidence of gallstones and related SGOT and SGPT biochemical factors in the Iranian population

Abstract

Received: 29 Oct 2021; Accepted: 3 Mar 2023

Introduction: Gallstones are one of the most common gastrointestinal diseases because genetic factors have not been yet identified. The ABCB11 gene locates on chromosome 2 and generates the Bile Salt Output Pump (BSEP) in human encoding by creating gallstone. Our aim of in the present study was to investigate the relationship between liver biochemical factors and ABCB11 gene polymorphism with the risk of gallstone.

Materials and Methods: The study was performed recruiting 100 gallstone patients and 100 healthy individuals in Golsar Hospital, Rasht, in 1397. After sonography, subjects were divided into patients and healthy groups and the relationship between disease and ABCB11 gene polymorphism was examined by ARMS-PCR. Typically, 10 samples were sampled for the required sequencing results. Differences between the two groups were determined by statistical analysis.

Results: In the present SGOT study, SGPT level was elevated in patients in comparison with healthy individuals ($P < 0.05$). The frequency of ABCB11 gene C allele between patient and healthy was 22.5% and 22% of the budget, respectively. There is no significant relationship between the frequency of alleles and genotypes in patients compared to healthy cases ($P > 0.05$). Under these conditions, the frequency of TT, TC and CC genotypes among individuals over 60 years of age were 27, 21 and 3, respectively. There is no significant relationship between gender and age with disease ($P / 0.05$). The mean age of patients over 60 years ($P = 0.0$) was significantly higher than healthy. People with homozygous TT genotype were more likely to develop the disease.

Discussion and Conclusion: The increased level of biochemical factors can predicts possibility of liver damage. The lack of correlation between ABCB11 and disease may be due to genetic differences between different races. Further studies with a larger group is essential.

Keywords: Gallstone disease (GD), Single nucleotide polymorphism (SNP), ABCB11, Cholecystitis, Bile salt exit pump (BSEP)

*Corresponding Author:

Department of Biochemistry
and Genetics, School of
Medicine, Qazvin university of
Medical Sciences, Qazvin,
Iran

Tel: +9828 33336001
E-mail: m.fathi@qums.ac.ir