فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۰ ص. ۲۲-۱۵

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن NKP46 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی بدون گلوتن

مریم خداپناه[۱]، محمد رستمی نژاد[۲*]، مهرداد هاشمی[۳]، حمید اسدزاده عقدائی[۴]

[۱] گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] مرکز تحقیقات علوم همگرای پزشکی فرهیختگان، بیمارستان فرهیختگان، دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تهران، ایران

[۴] مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[*](نویسنده مسئول مکاتبات): m.rostamii@gmail.com

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۰

چکیده

گیرنده‌های سایتوتوکسیک طبیعی از جمله NKP46 می‌توانند در تقویت و تداوم پاسخ‌های ایمنی علیه عفونت ویروسی، که از جمله عوامل موثر بر پیشرفت التهاب در بیماری سلیاک است، نقش مهمی داشته باشند. از طرفی اینترلوکین ۱۵، که از جمله سایتوکاین‌های التهابی مهم در بیماری زایی سلیاک است، نیز می‌تواند با تاثیر بر تغییر بیان این نوع از گیرنده‌ها سبب آتروفی پرزهای روده‌ای گردد. هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان ژن NKP46 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی بدون گلوتن در مقایسه با افراد سالم بود. ابتدا تعداد 20 نمونه بیوپسی روده باریک از بیماران مبتلا به سلیاک و 20 نمونه از افراد سالم جمع‌آوری شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، جفت پرایمر اختصاصی ژن طراحی و PCR انجام گردید و سپس بررسی بیان ژن NKP46 با روش Real-time PCR صورت گرفت. ۸ نفر زن (۴۰%) و ۱۲ نفر مرد (۶۰%) در گروه بیمار و تعداد ۷ نفر زن (۳۵%) و ۱۳ نفر مرد (۶۵%) در گروه کنترل بررسی شدند. بیان ژن NKP46 در بیماران سلیاکی تحت رژیم فاقد گلوتن در مقایسه با افراد سالم اختلاف معناداری نشان نداد. عدم مشاهده اختلاف معنادار بین گروه بیمار و کنترل می‌تواند ناشی از تاثیرات رعایت رژیم غذایی توسط این بیماران باشد. انجام مطالعات تکمیلی جهت دستیابی به پروفایل بیان کامل تری از این گیرنده‌ها و همچنین ارزیابی جهش‌های موثربر بیان آنها در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک درمان شده و درمان نشده در مطالعات بعدی توصیه می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: بیماری سلیاک، NKP46، رژیم فاقد گلوتن، پرایمر، PCR.

مقدمه

بیماری سلیاک[1] یک اختلال خودایمن مزمن گوارشی است که در افراد مستعد ژنتیکی در اثر مصرف پروتئین گلوتن موجود در غلات به وجود می‌آید [۱-۳]. درواقع، مصرف گلوتن باعث ایجاد پاسخ ایمنی در روده کوچک شده و این واکنش به پرزهای روده کوچک آسیب می‌رساند، در نتیجه از جذب برخی مواد مغذی جلوگیری به عمل آمده و این بیماران دچار کاهش وزن و اختلالات گوارشی مانند اسهال و نفخ می‌گردند [۴]. بیماری سلیاک به طور متوسط در ۱-۰/۵ درصد جمعیت اروپا و آمریکا گزارش شده است [۵]. در ایران نیز نتایج مطالعات متعدد نشان داده است که شیوع این بیماری در کشور حدود یک درصد است [۵, ۶]. قوی ترین ارتباط ژنتیکی در بیماری سلیاک، همراهی آن با مجموعه HLA-II است و در اواخر سال ۱۹۸۰ مشخص شد که این همراهی با لوکوس HLA-DQ (HLA-DQ2 و HLA-DQ8) می‌باشد (۷). حدود ۹۰-۹۵% بیماران مبتلا به بیماری سلیاک، دارای آلل‌های HLA- DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) و حدود ۵% آنها نیز دارای آلل‌های HLA-DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302) هستند [۸,۲].

پاسخ ایمنی ذاتی در پاتوژنز بیماری سلیاک نقش اساسی دارد و سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین ۱۵ (IL-15) با اثر بر لنفوسیت‌های داخل اپیتلیالی[2] (IEL)، از جمله عوامل آغازکننده این پاسخ هستند [۱]. اینترلوکین ۱۵ به طور کلی القا کننده بیان مولکول‌های استرس (MICA) و لیگاند آن‌ها (گیرنده NKG2D) بر روی لنفوسیت‌های داخل اپی‌تلیالی فعال شده است که در نتیجه آن آپوپتوز سلول‌های اپی‌تلیالی و تخریب بافت روده رخ می‌دهد (۱, ۹). سلول‌های کشنده طبیعی[3] (NK) جزء سلول‌های مهم سیستم ایمنی ذاتی بوده و اولین خط دفاعی در برابر ویروس‌ها و سلول‌های توموری می‌باشند (۱۰). این سلول‌ها دارای دو نوع گیرنده‌های فعال کننده و مهاری هستند. گیرنده‌های سایتوتوکسیک طبیعی (NCR) از جمله مهمترین گیرنده‌های فعال کننده این سلول‌ها به شمار می‌روند [۱۱, ۱۲]. یکی از گیرنده‌های سایتوکسیک طبیعی، NKp46 است که به خانواده ایمونوگلوبولین‌ها تعلق داشته و درواقع اولین گیرنده سایتوتوکسیک طبیعی است که بر روی سلول‌های NK بیان می‌شود [۱۳]. این گیرنده در نواحی ٤ LCR بر روی کروموزوم انسانی 19q13.4 کد می‌گردد (۱۴). سلول‌های بیان کننده NKP46 گروانزیم B (پاسخ دهنده به گیرنده‌های شبه تول (TLR)) و اینترلوکین ۲۲ (سایتوکاین مرتبط با حفاظت از سد روده‌ای و همئوستاز ایمنی) تولید می‌کنند و به عفونت‌های میکروبی پاسخ می‌دهند. در مطالعات ذکر شده است که این گیرنده‌های سایتوتوکسیک طبیعی می‌توانند در تقویت و تداوم پاسخ‌های ایمنی علیه عفونت ویروسی، که از جمله عوامل موثر بر پیشرفت التهاب و وخیم تر شدن بیماری سلیاک است، نقش مهمی داشته باشد [۱۰]. از طرفی اینترلوکین ۱۵، که از جمله سایتوکاین‌های التهابی مهم در مسیر بیماری زایی سلیاک است، میتواند با تاثیر بر تغییر بیان این نوع از گیرنده‌ها نیز سبب آتروفی پرزهای روده‌ای گردد [۱۵-۱۷]. هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان ژن NKP46 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی بدون گلوتن در مقایسه با افراد سالم بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

در این مطالعه، 20 بیمار مبتلا به بیماری سلیاک تحت درمان با رژیم غذایی فاقد گلوتن، که بیماری آن‌ها با انجام آزمایشات سرولوژی (tTG IgA, Anti EMA) و بررسی نمونه بیوپسی روده تایید شده بود، و به بیمارستان طالقانی مراجعه کرده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این، 20 نفر از افرادی که برای هردو آنتی‌بادی منفی بوده و با بررسی بیوپسی مشخص گردید که آتروفی ویلی ندارند (Marsh0) (در حالیکه غذای حاوی گلوتن مصرف می‌کردند) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. از افراد شرکت‌کننده نمونه بیوپسی روده باریک توسط پزشک

[1] Celiac disease
[2] Intraepithelial lymphocytes
[3] Natural killer cell
[4] Leukocyte receptor complex

متخصص و با استفاده از اندوسکوپی گرفته شد و پرسشنامه نیز توسط محقق تکمیل گردید. بیماران مورد بررسی در این مطالعه، حداقل به مدت یک سال تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن بودند. معیار ورود نمونه‌ها به مطالعه در گروه بیماران، بیماری سلیاک تایید شده و عدم ابتلا به بیماری‌های خود ایمنی دیگر بود. معیار ورود نمونه‌ها در گروه کنترل نیز عدم سابقه ابتلا به بیماری سلیاک در خود و یا بستگانشان و همچنین دارا بودن نتیجه پاتولوژی طبیعی در نظر گرفته شد. فاکتورهای خروج برای گروه بیمار، حاملگی، وجود سابقه هر نوع بیماری مزمن دستگاه گوارش فوقانی، ابتلا به سایر بیماری‌های خود ایمن، سرطان و یا عفونت هلیکوباکتر در نظر گرفته شد؛ و این موارد بر اساس تشخیص و معاینات پزشک متخصص و مشاور طرح، پرونده بیمار و سؤالاتی که از بیمار پرسیده می‌شد لحاظ گردید. فاکتورهای خروج برای گروه کنترل، حاملگی و ابتلا به هرگونه بیماری التهابی و خود ایمنی از جمله بیماری سلیاک، بیماری‌های خونی، سرطان کولورکتال، عفونت دستگاه گوارش، روماتوئید آرتریت و دیابت در نظر گرفته شد. تمام این موارد با مشورت و پس از تائید پزشک متخصص و مشاور طرح انجام شد. از کلیه افراد وارد شده به مطالعه رضایت نامه آگاهانه کتبی با مجوز کمیته اخلاق پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دریافت گردید (کد اخلاق IR.SBMU.RIGLD.REC.1399.035).

استخراج RNA از بافت و سنتز cDNA:

استخراج RNA با استفاده از کیت YTA Total RNA Purification Mini Kit یکتا تجهیزآزما (تایوان) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج بررسی کمی غلظت و خلوص RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ صورت گرفت و RNAهای به دست آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد، سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از پرایمر اولیگو (dT) و کیت شرکت بایوفکت (کره) (2 step 2x RT- PCR Pre- mix Taq) بر اساس پروتکل موجود در کیت صورت گرفت.

طراحی پرایمر

توالی ژن NKP46 و ژن مرجع بتا اکتینین (β-act) از پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) دریافت و به کمک نرم‌افزار Gene Runner پرایمرها برای توالی‌های مورد نظر طراحی شدند. پس از طراحی، اگزون به اگزون بودن پرایمرها بررسی شد و سپس، با استفاده از نرم افزار آنلاین NCBI/Primer-BLAST آن‌ها را از نظر توالی و اتصال اختصاصی به ژن هدف بررسی نموده و از ویژگی پرایمرها برای نواحی مکمل خود، اطمینان کامل حاصل گردید. توالی پرایمرها در جدول ۱ درج گردید.

واکنش PCR

برای انجام دادن فرآیند PCR به پرایمر با غلظت 51 پیکومول نیاز است. به منظور آماده کردن پرایمرها براساس مقداری که شرکت بر روی تیوب پرایمر نوشته است به آن آب مقطر دیونیزه اضافه و پیپتاژ شد. سپس ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرارگرفت. در انتها به میزان مورد نیاز از پرایمر اصلی با غلظت ۱۰۰ پیکومول پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول رقیق شد.

در ابتدا به روش گرادیانت PCR، چندین دمای مختلف در بازه دمایی 60-58 درجه برای پرایمر در نظر گرفته شد و سپس با استفاده از کیت PCR، PCR Mastermix, Yekta Tajhiz Azma, Taiwan, YTA یکتا تجهیز آزما (تایوان) مخلوط PCR برای پرایمر مورد نظر آماده شد. بدین منظور به میزان 2.5 µl از بافر، 1 µl از dNTP، 0.5 µl از هریک از پرایمرهای Forward و Reverse، 0.5 µl از Taq DNA polymerase و 1 µl از cDNA استفاده گردید و با آب RNase Free به حجم ۲۵ µl رسانده شد و بعد در دستگاه ترموسایکلر قرارداده شد. برنامه دمایی آن روی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸-۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه تنظیم گردید. به منظور تکثیر هرچه بیشتر این واکنش سه مرحله‌ای ۴۰ بار تکرار گردید.

جهت اطمینان از تکثیر قطعه ژني دربرگیرنده ژن NKP46، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵% برای محصولات PCR انجام شد. برای تعیین اندازه قطعات الکتروفورز شده از Ladder 50 bp شرکت Fermentas استفاده گردید. در انتهای کار، بوسیله دستگاه Gel documentationعکس ژل تحت اثر نور فرابنفش گرفته شد.

واکنش Real Time PCR

در این مطالعه به منظور بررسي بیان ژن NKP46 از فرم غیر اختصاصی Real-time PCR (استفاده از سایبرگرین) به روش Relative Quantitative Real-time PCR و دستگاه Rotor-Gene Q Series استفاده شد. ژن مرجع در این مطالعه ژن β-act می‌باشد. برای اطمینان از مفاهیم آماری، هر نمونه به صورت Duplicate گذاشته شد. تهیه مخلوط واکنش طبق پروتکل کیت Amplicon انجام گردید. برای تهیه میکس واکنش، برای ژن NKP46 و کنترل داخلی (β-act)، میزان ۱۰ میکرولیتر از(Master mix (10 μM، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای Forward وReverse، ۱ میکرولیتر cDNA به هر میکروتیوب اضافه شد و در پایان با استفاده از آب مقطر دیونیزه حجم هر میکروتیوب به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس برنامه دمایی مطابق جدول ۲ برای آن‌ها تعریف گردید.

آنالیز داده‌ها

برای آنالیز داده‌های Real time از روش دلتا دلتا ct استفاده شد و با بهره‌گیری از نرم‌افزار prism (v.7) منحنی نتایج حاصل از Real time PCR رسم شد.

یافته‌ها

اطلاعات افراد شرکت کننده:

در این مطالعه تعداد ۸ نفر زن (۴۰%) و ۱۲ نفر مرد (۶۰%) در گروه بیمار و تعداد ۷ نفر زن (۳۵%) و ۱۳ نفر مرد (۶۵%) در گروه کنترل بررسی شدند. شایع‌ترین علائم گوارشی بیماران نفخ و اسهال بوده و شایع‌ترین علائم غیرگوارشی آن‌ها خستگی (۶۷/۵%)، کاهش وزن (۴۵%) و کم‌خونی (۴۷/۵%) بود (شکل ۱).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه

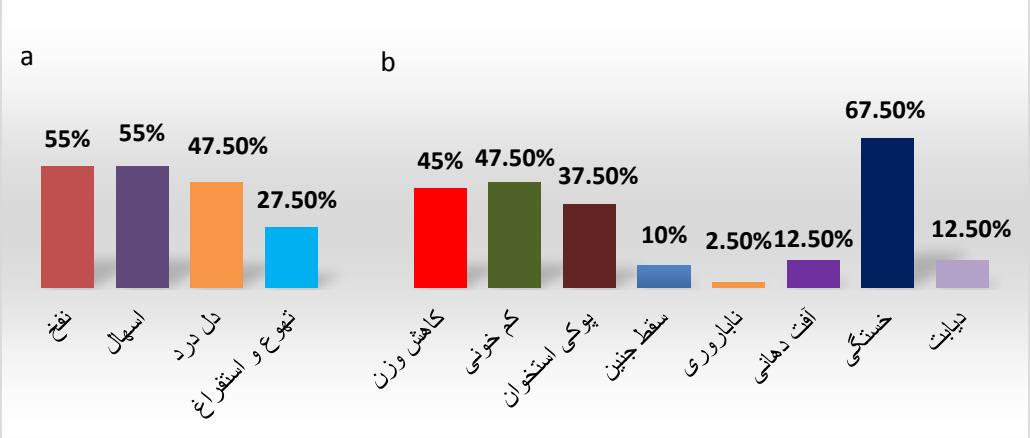
نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر	دمای ذوب°C	درصد GC %
NKP46 (Forward)	GGATCTGAAAGCTGGTGTTGAG	۲۲	۵۹/۲۵	۵۰/۰۰
NKP46 (Reverse)	TAGTTCTCCCACCCTCTGCAT	۲۱	۶۰/۲۷	۵۲/۳۸
β-act (Forward)	ATGTGGCCGAGGACTTTGATT	۲۱	۴۷\۶۲	۵۷/۸۷
β-act (Reverse)	AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG	۲۱	۵۹\۳۸	۵۹/۸۲

جدول ۲: برنامه چرخه دمایی برای ژن NKP46 در Real-time PCR

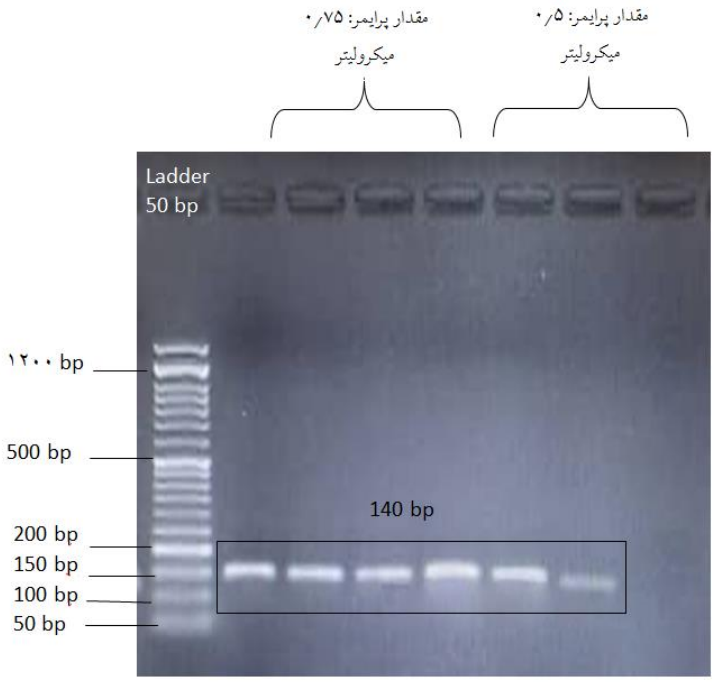
مراحل	دما	زمان	تکرار
مرحله اول دناتوراسیون اولیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱۵ دقیقه	۱ سیکل
مرحله دوم (Real Time PCR)	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵۹ درجه سانتی‌گراد ۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱۵ ثانیه ۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه	۴۰ سیکل
مرحله سوم	Melt curve		

نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز روی آگارز 1.5 درصد:

به منظور ارزیابی صحیح بودن فرایند استخراج RNA، سنتز cDNA و اتصال اختصاصی پرایمر به توالی هدف واکنش PCR برایcDNA های سنتز شده انجام شد. نتایج بدست آمده صحت روند کار را تایید کرد. طی انجام فرآیند PCR ژن مورد نظر بوسیله پرایمر اختصاصی خود تکثیر شد و بعد از تمام شدن واکنش، محصول را بر روی ژل آگارز ۱٫۵% بارگذاری کرده و قطعه ژن در سایز مربوط به خود روی ژل مشاهده شد. در شکل ۲، قطعه تکثیری ژن مورد مطالعه توسط پرایمر اختصاصی ژن نشان داده شده است. نتایج حاصل از PCR والکتروفورز روی اگارز ۱/۵ درصد با مقدار پرایمر ۰٫۵ میکرولیتر در دماهای ۵۸، ۵۹ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین با مقدار پرایمر ۰/۷۵ میکرولیتر در دماهای ۵۸ و ۵۹ درجه سانتی‌گراد باندهای واضحی نشان داد بر همین اساس از مقدار پرایمر ۰٫۵ میکرولیتر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد جهت انجام واکنش Real-Time PCR استفاده شد.



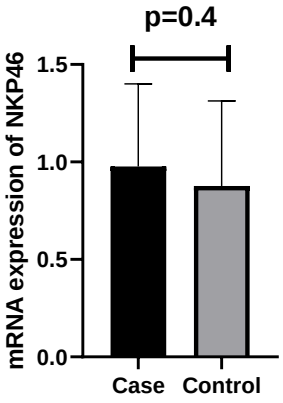
شکل ۱. علائم گوارشی (a) و غیر گوارشی (b) بیماران



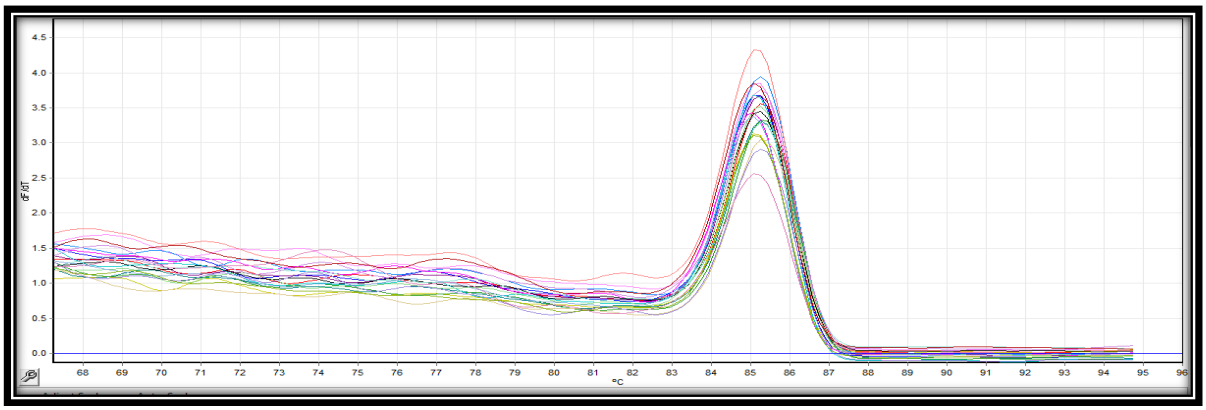
شکل ۲: عکس ژل نمونه‌های مورد بررسی با روش pcr

نتایج حاصل از انجام واکنش Real Time PCR

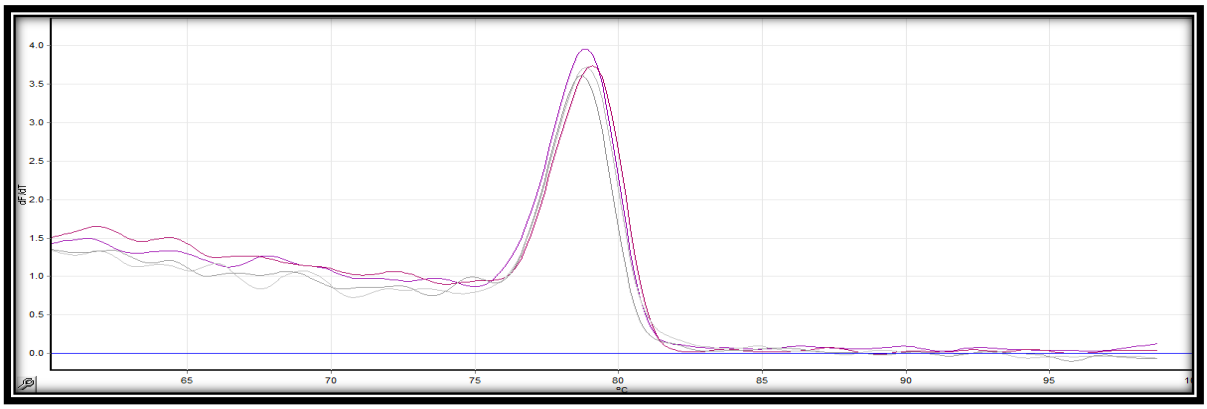
مقایسه بیان ژن NKP46، در نمونه‌های بافت روده کوچک دو گروه بیمار و کنترل در شکل ۳ آورده شده است. آنالیز آماری به روش t-Test روی نتایج سنجش بیان ژن NKP46 با استفاده از تکنیکReal-time PCR نشان داد که بیان ژن NKP46 در نمونه بیوپسی گروه بیمار نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت (Pvalue: 0.4) (شکل ۳). همچنین بین بیان این ژن و هیچ یک از علائم بیماران نیز ارتباط معناداری مشاهده نگردید. در نمودار ۱ و ۲ منحنی ذوب ژن NKP46 و منحنی ذوب ژن مرجع β act آورده شده است.



شکل ۳: میزان تغییرات بیان ژن NKP46 در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل



نمودار ۱: منحنی ذوب ژن NKP46



نمودار ۲: منحنی ذوب ژن مرجع β-act

بحث

در این مطالعه بیان ژن NKP46 به عنوان گیرنده فعال کننده سلول‌های کشنده طبیعی که دارای اثر بر از بین بردن عفونت‌های ویروسی (از جمله عوامل محیطی موثر بر پیشبرد التهاب در بیماری سلیاک) و همچنین تخریب پرزهای روده‌ای هستند، در نمونه بافت روده بیماران مبتلا به بیماری سلیاک با جفت پرایمرهای اختصاصی، که برای اولین بار در ایران طراحی شدند و به طور اختصاصی می‌توانند ژن مورد نظر را تکثیر نماید، ارزیابی گردید. نتایج این مطالعه حاکی از عدم وجود تفاوت معنادار بین بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت درمان با رژیم غذایی فاقد گلوتن و گروه کنترل سالم در بیان این ژن بود. بیماری سلیاک یک اختلال خود ایمن و مزمن گوارشی است که در افراد مستعد از نظر ژنتیکی در اثر مصرف پروتئین گلوتن غلات به وجود می‌آید (۲). سلول‌های کشنده طبیعی به خانواده بزرگ سلول‌های لنفاوی ذاتی تعلق دارند و دارای توانایی برای مبارزه با عفونت‌ها و رشد تومور هستند [۱۸]. نتایج مطالعات حاکی از آن است که سلول‌های NK می‌توانند در ترویج پاسخ ایمنی جهت کنترل اختلالات التهابی و خودایمنی موثر باشند [۱۹]. سلول‌های بیان کننده NKP46 گروآنزیم B تولید کرده و نقش بسزایی در از بین بردن سلول‌های آلوده به ویروس دارند. همچنین، این سلول‌ها اینترلوکین ۲۲ که سایتوکاین مرتبط با حفاظت از سد روده‌ای و همئوستاز ایمنی است را نیز تولید می‌کنند [۱۰]. از طرفی القای بیان این گیرنده‌ها توسط اینترلوکین۱۵ نیز می‌تواند منجر به آتروفی پرزهای روده‌ای گردد [۱۵-۱۷]. در مورد بیان ژن NKP46 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک مطالعات محدودی صورت گرفته است. jabri و همکارانش در سال ۲۰۰۰ در مطالعه‌ای بر روی لنفوسیت‌های داخل اپیتلیالی جدا شده از۵۱ بیمار مبتلا به بیماری سلیاک در مقایسه با ۵۰ فرد کنترل دریافتند که بیان گیرنده‌های NK از جمله NKP46 درگروه بیماران نسبت به افراد کنترل تفاوت چشمگیری نداشته است [۲۰]. Marafini و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های تک هسته ای داخل اپی تلیالی جداشده از دئودنوم بیماران سلیاکی ۱۰ درمان شده و ۱۶ درمان نشده در مقایسه با ۱۶ فرد کنترل دریافتند که تعداد سلول‌های کشنده طبیعی بیان کننده NKP46 در بیماران نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری ندارد [۱۰]. نتایج این مطالعات همراستا با یافته مطالعه ما بود. از طرفی Morgan و همکارانش در سال ۲۰۱۸ با بررسی بیان NKP46 در نمونه‌های بیوپسی روده کوچک ۷۲ بیمار سلیاکی درمان نشده و بیمار سلیاکی مقاوم به درمان نوع یک و ۶۰ بیمار سلیاکی مقاوم به درمان نوع دو در مقایسه با ۱۳ فرد کنترل که با کمک روش فلوسایتومتری نشان دادند که بیان NKP46 در لنفوسیت‌های داخل اپیتلیالی بدخیم جدا شده از بیماران مبتلا به بیماری سلیاک مقاوم به درمان نوع دو نسبت به بیماران سلیاکی درمان نشده و بیماران سلیاکی مقاوم به درمان نوع یک و گروه کنترل افزایش معناداری داشته است. آن‌ها ارزیابی بیان NKP46 را به عنوان روشی برای تشخیص بیماری سلیاک مقاوم به درمان نوع دوم از نوع اول و استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد NKP46 را به عنوان یک درمان احتمالی برای بیماران سلیاکی مقاوم به درمان دانستند [۲۱].

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر به ما نشان داد که می توان از جفت پرایمر طراحی شده در این تحقیق جهت بررسی بیان ژن NKP46 در نمونه بیوپسی روده بیماران مبتلا به بیماری سلیاک استفاده کرد. عدم مشاهده اختلاف معنادار در بیان این گیرنده بین گروه بیمار و کنترل میتواند ناشی از تاثیرات رعایت رژیم غذایی توسط این بیماران باشد. از آن جایی که بیان هریک از گیرنده‌های سایتوتوکسیک طبیعی میتواند به صورت مستقل از یکدیگر تغییر کند، انجام مطالعات تکمیلی جهت دستیابی به پروفایل بیان کامل تری از این گیرنده‌ها و همچنین ارزیابی جهش‌های موثربر بیان آنها در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک درمان شده و درمان نشده در مطالعات بعدی توصیه می‌گردد.

منابع

[1] Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. BMC medicine. 2019; 17(1):1-20.

[2] Stamnaes J, Sollid L, editors. Celiac disease: autoimmunity in response to food antigen. Seminars in immunology; 2015: Elsevier.

[3] Asri N, Rostami-Nejad M, Anderson RP, Rostami K. The Gluten Gene: Unlocking the Understanding of Gluten Sensitivity and Intolerance. The application of clinical genetics. 2021; 14:37-50.

[4] Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. Nature Reviews Immunology. 2002;2(9):647-55.

[5] Nejad MR, Rostami K, Emami MH, Zali MR, Malekzadeh R. Epidemiology of celiac disease in Iran: a review. Middle East Journal of Digestive Diseases. 2011; 3(1): 5.

[6] Ashtari S, Najafimehr H, Pourhoseingholi MA, Rostami K, Asadzadeh-Aghdaei H, Rostami-Nejad M, et al. Prevalence of celiac disease in low and high risk population in Asia-Pacific region: a systematic review and meta-analysis. Scientific reports. 2021; 11(1): 2383.

[7] Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. Annual review of immunology. 2011; 29: 493-525.

[8] Rostami-Nejad M, Vafaee R, Ehsani-Ardakani M, Aghamohammadi N , Keramatinia A, Abdi S, et al. The Screening of Critical Related Genes in Celiac Disease Based on Intraepithelial Lymphocytes Investigation: A Bioinformatics Analysis. Galen Medical Journal. 2019; 8: 1407.

[9] Escudero-Hernández C, Peña AS, Bernardo D. Immunogenetic pathogenesis of celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. Current gastroenterology reports. 2016; 18(7): 36.

[10] Marafini I, Monteleone I, Di Fusco D, Sedda S, Cupi ML, Fina D, et al. Celiac disease-related inflammation is marked by reduction of Nkp44/Nkp46-double positive natural killer cells. PloS one. 2016; 11(5).

[11] Becker PS, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2016; 65(4): 477-84.

[12] Gianchecchi E, Delfino DV, Fierabracci A. NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses. Autoimmunity reviews. 2018; 17(2): 142-54.

[13] Ma Y, Li X, Kuang E. Viral evasion of natural killer cell activation. Viruses. 2016; 8(4): 95.

[14] Barrow AD, Colonna M. The natural cytotoxicity receptors in health and disease. Frontiers in immunology. 2019; 10: 909.

[15] Aghamohamadi E, Kokhaei P, Rostami-Nejad M, Pak F, Rostami K, Moradi A, et al. Serum Level and Gene Expression of Interleukin-15 Do Not Correlate with Villous Atrophy in Celiac Disease Patients. Genet Test Mol Biomarkers. 2020; 24(8): 502-7.

[16] Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. Immunol Rev. 2014; 260(1): 21-34.

[17] Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. Gastroenterology. 2003; 125(3): 730-45.

[18] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science. 2011; 331(6013): 44-9.

[19] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol. 2008; 9(5): 503-10.

[20] Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, et al. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. Gastroenterology. 2000; 118(5): 867-879.

[21] Cheminant M, Bruneau J, Malamut G, Sibon D, Guegan N, Van Gils T, et al. NKp46 is a diagnostic biomarker and may be a therapeutic target in gastrointestinal T-cell lymphoproliferative diseases: a CELAC study. Gut. 2019; 68(8): 1396-405.

Journal of Developmental Biology
Vol. 13, No. 3, Summer 2021

Evaluation of NKP46 gene expression in celiac disease patients on a gluten free diet

Khodapanah M.[1], Rostami-Nejad M.[2*], Hashemi M.[1,3], Asadzadeh-Aghdaei H.[4]

[1] Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] Farhikhtegan Medical Convergence science Research Center, Farhikhtegan Hospital Tehran Medical sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[4] Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* (Corresponding author): m.rostamii@gmail.com

Received: July 2021 Accepted: September 2021

Abstract

According to the previous studies, natural cytotoxicity receptors including NKP46 can play an important role in strengthening and sustaining immune responses against viral infection, which may have a role in the progression of inflammation in celiac disease. Moreover, Interleukin-15, which is one of the most important inflammatory cytokines in celiac disease pathogenesis, can also change the expression of this type of receptors that leads to atrophy of intestinal villi. The aim of this study was to evaluate the intestinal expression of NKP46 gene in patients with celiac disease on a gluten-free diet in comparison with healthy individuals. In this study, 20 small intestinal biopsy samples were collected from patients with celiac disease and 20 samples from healthy subjects. After RNA extraction and cDNA synthesis, gene-specific primer pairs were designed, PCR conducted and NKP46 gene expression was evaluated by real-time PCR method. 8 females (40%) and 12 males (60%) in the patient group and 7 females (35%) and 13 males (65%) in the control group were studied. NKP46 gene expression was not significantly different between celiac patients who were on a gluten-free diet and healthy individuals (Pvalue: 0.4). The lack of significant difference in the expression of this receptor between the patient and control groups can be due to the effects of gluten-free diet adherence. Additional studies are recommended to achieve a more complete expression profile of these receptors and possible mutations affecting their expression in treated and untreated celiac disease patients.

Keywords: Celiac disease, NKP46, Gluten-free diet, Primer, PCR.