

ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن NOD2 با وقوع بیماری پیوند بر علیه میزبان در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد

شهربانو رستمی^۱، لیلیا احمدی‌نیا^۲، بایزید قادری^۳، سید اسداله موسوی^۴، سعید آبرون^۵، رضا حاجی حسینی^۶، بهرام چهاردولی^۱، حبیبه قدیمی^۷، احمد رضا شمشیری^۸، اردشیر قوام‌زاده^۹، کامران علی مقدم^{۱۰}

چکیده

سابقه و هدف

بیماری پیوند بر علیه میزبان یکی از عوارض تهدیدکننده زندگی متعاقب پیوند است. در مطالعه‌های اخیر، ارتباط قابل توجهی بین پیامد پیوند و سه پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن NOD2 نشان داده شده است. در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن NOD2 با وقوع GVHD در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد تحت پیوند آلوژن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه گذشته‌نگر، ژنوتایپ‌های NOD2 به روش PCR-SSP در ۱۲۴ بیماری که تحت پیوند آلوژن قرار گرفته بودند و اهداکنندگان آن‌ها مشخص شده بود بررسی و سپس ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن NOD2 با وقوع GVHD حاد و مزمن مورد ارزیابی قرار گرفت. بیماران به طور میانگین به مدت ۴۰ ماه (۲۸-۷۷ ماه) مورد پایش قرار گرفتند. آنالیزهای آماری با استفاده از آزمون کای‌دو و نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ انجام شد.

یافته‌ها

شیوع موتاسیون در اهداکنندگان و بیماران مشابه (۱/۱۲/۱٪) به دست آمد. در سه جفت بیمار- اهداکننده (۲/۲/۴٪)، پلی مورفیسم‌ها در هر دو نفر شناسایی شد که در نتیجه فراوانی کلی در جفت‌های پیوندی ۲۱/۸٪ به دست آمد. تفاوت معناداری از نظر وقوع GVHD حاد و مزمن در حالتی که زوج‌های گیرنده/ اهداکننده دارای SNP (به ترتیب ۵۲٪ و ۵۶٪) با زوج‌های فاقد SNP (به ترتیب ۵۰/۵٪ و ۵۵٪) مقایسه شدند، مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

پلی مورفیسم‌های مطالعه شده، تاثیری در وقوع GVHD حاد و مزمن نداشتند. مطالعه‌های بیشتری برای تعمیم نتایج به سایر بیماری‌ها لازم است. به علاوه سایر پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی این ژن نیز برای شناسایی این ارتباط باید مورد مطالعه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: پیوند سلول‌های بنیادی خونساز، بیماری پیوند علیه میزبان، PCR

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۸۹/ ۵/۱۲

- ۱- دانشجوی PhD هماتولوژی - مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۲- کارشناس ارشد بیوشیمی - دانشگاه پیام نور
- ۳- فوق تخصص خون و انکولوژی - مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- فوق تخصص خون و انکولوژی - استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵- PhD خون‌شناسی - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
- ۶- PhD بیوشیمی - استادیار دانشگاه پیام نور
- ۷- کارشناس میکروبیولوژی - مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۸- PhD آمار - مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۹- فوق تخصص خون و انکولوژی - استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۱۰- مؤلف مسؤول: فوق تخصص خون و انکولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - صندوق پستی: ۱۴۱۱۴

مقدمه

پیوند آلوژن سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک، به عنوان درمان قطعی در بسیاری از بدخیمی‌های خونی به کار برده می‌شود. بیماری پیوند بر علیه میزبان (GVHD = Graft Versus Host Disease) از عوارض عمده و از عوامل اصلی مرگ و میر بعد از پیوند آلوژن می‌باشد که مشخصه آن آسیب به سطوح اپی‌تلیال روده، کبد و پوست است. عامل این ضایعات، سلول‌های T آلوراکتیو از منشا اهداکننده می‌باشند که به تفاوت‌های آنتی‌ژنی موجود بر روی سلول‌های میزبان پاسخ داده و برای ایمنی ضد تومور و ضد میکروبی ضروری هستند. بنابراین انتخاب صحیح اهداکننده در جلوگیری از GVHD شدید حایز اهمیت می‌باشد. با این که آنتی‌ژن‌های سازگاری بافتی HLA ماژور و مینور نقش اصلی را در ایجاد و تعیین شدت GVHD بر عهده دارند، ولی اخیراً به نقش پلی‌مورفیسم ژن‌های درگیر در ایمنی نیز توجه شده است. شناسایی این فاکتورهای خطر می‌تواند در انتخاب اهداکننده مناسب کمک کننده باشد (۱).

پروتئین NOD2 (سیتوپلاسمی Nucleotide-binding Oligomerisation Domain 2)، به وسیله ژن CARD15 (Caspase Recruitment Domain 15) واقع بر روی کروموزوم ۱۶ کد می‌شود. این پروتئین به صورت یک رسپتور شناسایی‌کننده الگو عمل کرده و مورامیل دی‌پپتید موجود در دیواره سلولی اکثر باکتری‌ها را شناسایی می‌کند (۲، ۱).

از انواع پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی SNP (Single Nucleotide Polymorphism) شناخته شده در ژن NOD2/CARD15، ارتباط سه پلی‌مورفیسم که با اسامی SNP 13 (p.G908R) و SNP8 (p.R702W)، SNP 12 (p.L1007fs) خوانده می‌شوند با بیماری‌های کرون (Crohn's disease) و سندروم Blau نشان داده شده است (۳). اخیراً این پلی‌مورفیسم‌ها به عنوان یک فاکتور خطر مؤثر بر شیوع و شدت بیماری پیوند بر علیه میزبان (GVHD) مطرح شده اند (۹-۴).

مطالعه حاضر جهت بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم در ژن NOD2 با افزایش خطر GVHD حاد و مزمن در بیماران

مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد که تحت پیوند آلوژن از دهنده کاملاً شبیه خواهر یا برادری قرار گرفته بودند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

بیماران:

این مطالعه به صورت گذشته‌نگر و بر روی ۱۲۴ بیمار مبتلا به انواع لوسمی‌های میلوئیدی حاد که در مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تحت پیوند آلوژنیک مغز استخوان از دهنده کاملاً شبیه خواهری یا برادری قرار گرفته بودند، و همین طور اهداکنندگان آنها انجام شد.

بررسی پلی‌مورفیسم:

استخراج DNA ژنومی از نمونه خون محیطی به روش استاندارد اشباع نمک انجام شد. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی که در این مطالعه بررسی شدند عبارتند از: از (SNP 8) T → C (2104C)، (SNP 12) C → G (2722G) و (SNP 13) C → insC (3020insC)، برای شناسایی این پلی‌مورفیسم‌ها از روش SSP-PCR (Specific Primer – polymerase Chain Reaction) استفاده شد (۱۰).

واکنش‌های PCR-SSP جداگانه بر روی انواع Wild Type (WT) و SNP اگزون‌های ۴ و ۸ که به ترتیب SNP‌های ۸ و ۱۲ بر روی آنها قرار دارند، انجام شد. برای کنترل نمونه‌های منفی از تکثیر بخشی از ژن A وابسته به زنجیره MHC کلاس I (MICA) استفاده شد. علاوه بر این نمونه‌های کنترل مثبت (نمونه بیمارانی که تعیین توالی شده بودند) و منفی هم در هر مرحله کاری گذاشته شد (جدول ۱). برای بررسی پلی‌مورفیسم SNP13 در اگزون ۱۱، واکنش به صورت مولتی پلکس انجام شد. به منظور کنترل نمونه‌های منفی از آغازگرهایی که در اطراف محل اتصال آغازگرهای مربوط به درج نقطه‌ای در اگزون ۱۱ (3020insC) متصل شده و قطعه‌ای به طول ۵۴۱ جفت باز را تکثیر می‌کردند، استفاده شد.

آغازگر سنس برای آلل WT با آغازگر آنتی سنس برای باند کنترل، یک قطعه ۳۳۶ جفت بازی را تکثیر می‌کرد،

جدول ۱: اسامی پلی مورفیسم ها ، توالی مربوط به آغازگرهای استفاده شده و طول توالی تکثیر شده

Specificity	Primer	Sequence 5'-3'	Primer location ^a	Product size ^b
Exon 4 WT (2104C)	5' NOD2 Ex4 WT 3' NOD2 Ex4	5'-CATCTgAgAAggCCCTgCTCC 5'-gTgCCCAACATTCAGgCCAC	2084-2104 2279-2298	215 bp
Exon 4 SNP 8 (2104C→T)	5' NOD2 Ex4 SNP 8 3' NOD2 Ex4	5'-CAICTgAgAAggCCCTgCTCT 5'-gTgCCCAACATTCAGgCCAC	2084-2104 2279-2298	215 bp
Exon 8 WT (2722G)	5' NOD2 Ex8 3' NOD2 Ex8 WT	5'-gATggAggCAggTCCACTTTgC 5'-TCgTCACCCACTCTgTTgCC	121,381-121,400 121,561-121,580	200 bp
Exon 8 SNP 12 (2722G→C)	5' NOD2 Ex8 3' NOD2 Ex8 SNP 12	5'-gATggAggCAggTCCACTTTgC 5'-TCgTCACCCACTCTgTTgCg	121,381-121,400 121,561-121,580	200 bp
Exon 11 WT/SNP 13 (3020Cins)	5' NOD2 Ex11 LF 3' NOD2 Ex11 LR 5' NOD2 Ex11 WT 3' NOD2 Ex11 SNP 13	5'-TggTACTgAgCCTTTgTTgATgAgCTC 5'-CATTCTTCAACCACATCCCCATTCTT 5'-CagAAgCCCTCCTgCAggCCCT 5'-CgCgTgTCATTCCTTTCATggggC	128,574-128,600 129,089-129,114 128,779-128,800 128,796-128,820	CB, 541 bp; WT, 336 bp; SNP 13, 247 bp
Exon 4 and 8 — Control Band	5' MICA Ex4 F 3' MICA Ex4 R	5'-CAgACTTgCAggTCAGgggTCCCg 5'-CAATgACTCTgAAgCACCAgCACT	8227-8250 8736-8759	533 bp

^a Numbering according to EMBL accession numbers AJ303140 (NOD2/CARD15) or X92841 (MICA).

^b bp Base Pairs, CB, Control Band; WT, Wild Type, SNP, Single Nucleotide Polymorphism.

متوسط برای مدت ۴۰ ماه) بود. بیماران در محدوده سنی بین ۵ تا ۵۵ سال (میانگین ۲۸/۸ سال) قرار داشتند. از ۱۲۴ بیمار دریافت کننده پیوند، ۷۳ نفر مرد (۵۹٪) و ۵۱ نفر زن (۴۱٪) بودند. از ۱۲۴ اهداکننده پیوند، ۴۶ نفر زن (۳۷٪) و ۷۸ نفر (۶۳٪) مرد بودند. شایع ترین نوع AML در میان بیماران لوسمی M2 با شیوع ۴۶/۸٪ و سپس لوسمی میلوئوبلاستیک M4 با شیوع ۲۳/۴٪ بود.

برای رژیم آماده سازی، ۹۶ نفر از بیماران (۷۷/۴٪) بوسولفان - سیکلوفسفامید و ۲۸ نفر از بیماران (۲۲/۶٪) بوسولفان - فلوئورابین دریافت نمودند. ۱۲۲ بیمار (۹۸/۴٪) در زمان پیوند دارای کمتر از ۵٪ بلاست های لوسمیک در گزارش لام مغز استخوان خود بودند و در دو مورد شمارش بلاست ها بیش از ۵٪ بود. در کلیه موارد، بیماران استم سل های به حرکت درآمده توسط GCSF (Granulocyte Colony - Stimulating Factor) را از اهداکنندگان کاملاً شبیه خواهری یا برادری دریافت کردند. تشخیص GVHD حاد و مزمن بر اساس معیارهای استاندارد انجام شد (۱۱).

پس از تحلیل نتایج حاصل از PCR نمونه ها جهت بررسی وجود سه پلی مورفیسم ژن NOD2، نتایج زیر به دست آمد: از ۱۲۴ زوج پیوندی در ۱۲ مورد پلی مورفیسم تنها در گیرنده پیوند (۹/۶۷٪) و نیز در ۱۲ مورد پلی مورفیسم تنها در گیرنده پیوند (۹/۶۷٪) یکی از سه

در حالی که یک آغازگر آنتی سنس اختصاصی برای موتاسیون 3020insC همراه با آغازگر سنس باند کنترل، باعث تکثیر یک قطعه ۲۴۷ بازی در افراد دارای SNP13 شد.

روش های آماری:

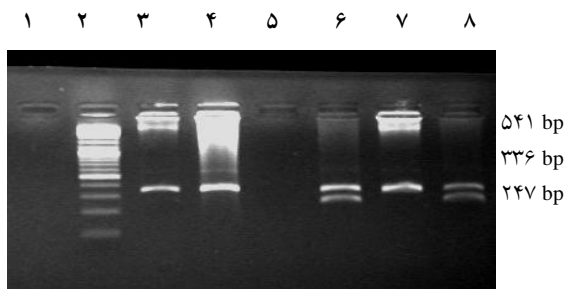
به منظور بررسی اثر پلی مورفیسم های ژن NOD2 بر GVHD بیماران، تاثیر وجود پلی مورفیسم در اهدا کننده و گیرنده، هم به صورت جداگانه و هم به صورت ترکیبی بررسی شد.

اطلاعات مربوط به بیماران در یک فرم پرسش نامه جمع آوری شد و کلیه داده ها با برنامه آماری SPSS ۱۱/۵ تجزیه و تحلیل گردید. در این مطالعه، برای اثبات معنی دار بودن تفاوت در میزان بروز aGVHD و cGVHD بین بیماران دارای پلی مورفیسم و فاقد آن، از آزمایش کای دو و پیرسون استفاده شد. کلیه آزمون های آماری به صورت two-sided انجام شد و p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان مقدار معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بیماران مورد مطالعه از آذر ۱۳۸۱ تا مهر ۱۳۸۵ در بیمارستان شریعتی تحت پیوند مغز استخوان از دهنده کاملاً شبیه خواهری یا برادری قرار گرفتند. پس از پیوند، حداقل زمان پایش بیماران ۲۸ ماه و حداکثر ۷۷ ماه (به طور

پیوند و هم گیرنده پیوند دارای یکی از سه پلی مورفیسم جهش یافته ژن NOD2 بودند. بنابراین فراوانی پلی مورفیسم‌ها در جمعیت گیرنده و اهداکننده یکسان به دست آمد و در مجموع ۲۱/۸٪ از ۱۲۴ زوج پیوندی دارای یکی از پلی مورفیسم‌های جهش یافته بودند (جدول ۲) (شکل‌های ۱-۳).



شکل ۳: ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ سایز مارکر (۱۰۰ bp)، ستون ۳ و ۴ بیماران فاقد پلی مورفیسم در اگزون ۱۱، ستون‌های ۵ و ۶ و ۷ بیماران دارای پلی مورفیسم در اگزون ۱۱.

میزان بروز GVHD حاد و مزمن در بیماران:

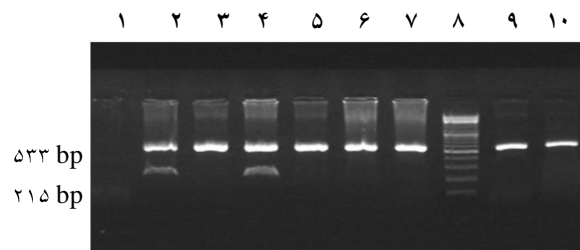
GVHD در طی ۱۰۰ روز بعد از پیوند را تحت عنوان GVHD مزمن نامگذاری می‌کنند و یک بیمار ممکن است به هر دو نوع GVHD مبتلا شود. در این مطالعه نیز تعدادی از بیماران هم به GVHD حاد و هم به GVHD مزمن مبتلا شدند. از ۱۲۴ بیمار دریافت کننده پیوند، ۶۳ بیمار پس از پیوند دچار GVHD حاد شدند (۵۱٪) و ۶۸ بیمار دچار GVHD مزمن گردیدند (۵۵٪).

میزان بروز GVHD حاد و مزمن در بیماران دارای پلی مورفیسم جهش یافته:

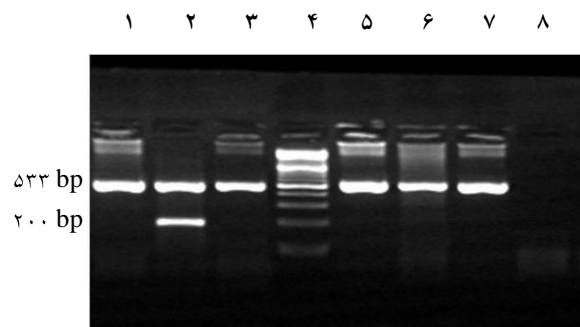
از ۱۵ بیمار دارای پلی مورفیسم جهش یافته ژن، ۶ نفر دچار GVHD حاد شدند (۴۰٪) و از ۱۰۹ بیماری که فاقد پلی مورفیسم جهش یافته این ژن بودند، ۵۷ نفر دچار GVHD حاد شدند (۵۲٪). همین طور از ۱۵ بیماری که دارای پلی مورفیسم جهش یافته ژن بودند، ۸ نفر دچار GVHD مزمن شدند (۵۳٪). از ۱۰۹ بیماری که فاقد پلی مورفیسم جهش یافته این ژن بودند، ۶۰ نفر

جدول ۲: فراوانی انواع SNP در گیرنده، اهداکننده و زوج‌های پیوندی

درصد	فراوانی انواع SNP	ژنوتیپ NOD2
۷۸/۲	۹۷ (زوج پیوندی)	نوع وحشی
۹/۶۷	۱۲ (اهدا کننده)	پلی مورفیسم تنها در اهداکننده
۹/۶۷	۱۲ (گیرنده)	پلی مورفیسم تنها در گیرنده
۲/۴	۳ (زوج پیوندی)	پلی مورفیسم در هر دو زوج پیوندی
۱۲/۱	۱۵ (اهدا کننده)	پلی مورفیسم در جمعیت اهداکننده
۱۲/۱	۱۵ (گیرنده)	پلی مورفیسم در جمعیت گیرنده
۲۱/۸	۲۷ (زوج پیوندی)	پلی مورفیسم در هر دو یا یکی از زوج‌های پیوندی



شکل ۱: ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ و ۴ بیماران دارای پلی مورفیسم در اگزون ۴، ستون‌های ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۰ بیماران فاقد پلی مورفیسم در اگزون ۴، ستون ۸ سایز مارکر (۱۰۰ bp).



شکل ۲: ستون‌های ۵، ۶، ۷ و ۱۱ بیماران فاقد پلی مورفیسم در اگزون ۸، ستون ۴ سایز مارکر (۱۰۰ bp)، ستون ۲ بیمار دارای پلی مورفیسم در اگزون ۸، ستون ۸ کنترل منفی

پلی مورفیسم جهش یافته ژن NOD2 شناسایی شد. همین طور در سه جفت از ۱۲۴ زوج پیوندی (۲/۴٪)، هم دهنده

بررسی فراوانی بروز GVHD حاد بیماران، در این زوج ها نتایج زیر حاصل شد: از ۲۷ زوج دارای SNPs، ۱۴ بیمار (۵۲٪) دچار GVHD حاد شدند. هم چنین از ۹۷ زوج پیوندی که هر دو فاقد SNPs بودند، ۴۹ بیمار (۵۰/۵٪) دچار GVHD حاد شدند. از ۲۷ زوج پیوندی دارای SNPs، ۱۵ بیمار (۵۶٪) دچار GVHD مزمن شدند. از این ۲۷ زوج پیوندی، تنها در ۳ زوج هم گیرنده و هم اهداکننده دارای پلی مورفیسم بودند که ۲ نفر از آن ها به GVHD حاد و هر سه به GVHD مزمن مبتلا شدند. در ۹۷ زوج پیوندی که هم خود و هم اهداکننده پیوند فاقد SNPs بودند، ۵۳ بیمار (۵۵٪) دچار GVHD مزمن شدند. به این ترتیب زمانی که تجزیه و تحلیل نتایج SNP را در زوج های پیوندی بررسی کردیم، وجود SNP تاثیری در بروز GVHD حاد و مزمن نداشت.

بحث

در سال های اخیر راه کارهای مختلفی برای محدود کردن GVHD، یکی از عوارض جدی و از عوامل عمده مرگ و میر بعد از پیوند آلوژن، بدون حذف کامل آن به منظور بهره برداری از اثر پیوند بر علیه لوسمی ارایه شده است. بنابراین شناسایی هر چه دقیق تر اهداکننده مناسب سلول های بنیادی هماتوپویتیک، می تواند مستقیماً در پی آمد پیوند تاثیر گذار باشد. علاوه بر آنتی ژن های سازگاری بافتی (HLA) ماژور و مینور، در مورد تاثیر پلی مورفیسم ژن های مربوط به سیستم ایمنی در GVHD بعد از پیوند مطالعاتی انجام شده است.

در مطالعه های مختلف، تاثیر پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی ژن NOD2 در نتیجه پیوند سلول های هماتوپویتیک در جمعیت های مختلف بررسی شده است. در این مطالعه که در مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی صورت گرفت، ارتباط ژن NOD2 در بیماران دچار لوکمی میلوئیدی حاد که پیوند آلوژن از دهنده کاملاً شبیه خواهری یا برادری دریافت نموده بودند، با افزایش خطر GVHD حاد و مزمن مورد بررسی قرار گرفت. مدت پی گیری در این مطالعه ۷۷-۲۸ ماه (میانگین ۴۰ ماه) بود. فراوانی

دچار GVHD مزمن شدند (۵۵٪). بنابراین تفاوت معناداری در میزان بروز GVHD حاد و مزمن در بیماران دارای SNPs در ژن NOD2 و بیماران فاقد این پلی مورفیسم وجود نداشت.

میزان بروز GVHD حاد در بیمارانی که اهداکننده پیوند دارای پلی مورفیسم جهش یافته بودند:

از ۱۵ بیماری که از اهداکننده دارای پلی مورفیسم جهش یافته ژن NOD2 پیوند دریافت نمودند، ۱۰ بیمار (۶۷٪) دچار GVHD حاد شدند. از ۱۰۹ بیماری که از اهداکننده دارای پلی مورفیسم طبیعی پیوند دریافت نمودند نیز ۵۳ بیمار (۴۹٪) دچار GVHD حاد شدند. از نظر بروز GVHD، ۱۰ بیمار (۶۷٪) دچار GVHD مزمن شدند و از ۱۰۹ بیماری که از اهداکننده دارای پلی مورفیسم طبیعی پیوند دریافت نمودند نیز ۵۸ بیمار (۵۳٪) دچار GVHD مزمن شدند. به این ترتیب تفاوت معناداری بین دو گروهی که از اهداکنندگان دارای پلی مورفیسم یا فاقد پلی مورفیسم پیوند دریافت کرده بودند، مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳: فراوانی بروز GVHD حاد و مزمن در دو گروه بیماران فاقد و دارای پلی مورفیسم های NOD2

P-value	cGVHD	P-value	aGVHD		
۰/۹	(۵۳)۸	۰/۴	(۴۰)۶	بله	پلی مورفیسم در گیرنده
	(۵۵)۶۰		(۵۲)۵۷	خیر	
۰/۳	(۶۷)۱۰	۰/۲	(۶۷)۱۰	بله	پلی مورفیسم در اهداکننده
	(۵۳)۵۸		(۴۹)۵۳	خیر	
۰/۹	(۶۰)۱۵	۰/۹	(۵۲)۱۴	بله	پلی مورفیسم در گیرنده یا اهداکننده
	(۵۵)۵۲		(۵۰/۵)۴۹	خیر	

میزان بروز GVHD حاد و مزمن در بیمارانی که یکی از زوج های پیوندی دارای پلی مورفیسم جهش یافته بود:

از میان ۱۲۴ زوج دهنده و گیرنده پیوند، در ۲۷ زوج پیوندی، یک و یا هر دو زوج دارای یکی از پلی مورفیسم های جهش یافته ژن NOD2 بودند. پس از

خویشاوند قرار گرفته بودند، پلی مورفیسم‌های یاد شده در ۲۱ درصد از بیماران و ۱۴ درصد از اهداکنندگان شناسایی شد. وجود SNPs در ژن NOD2 / CARD15 چه در بیمار دریافت‌کننده پیوند و چه در دهنده پیوند، با افزایش میزان GVHD حاد همراه بود (۵). از طرفی برخی دیگر از مطالعه‌ها نشان‌دهنده همراهی SNPs در ژن NOD2 با کاهش وقوع GVHD حاد هستند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط الما گاکالی و همکارانش در مورد ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن NOD2 با GVHD حاد در بیمارانی که تحت پیوند آلوژن قرار گرفته بودند انجام شد، خطر GVHD حاد در بیمارانی که SNP داشتند به طور مشخصی کاهش نشان داد (۴).

دلیل این که وجود SNP با کاهش وقوع aGVHD همراه بوده مشخص نیست ولی احتمالاً گیرنده‌هایی که در ژن NOD2 دارای پلی مورفیسم هستند، قادر به ایجاد پاسخ GVHD مؤثر نیستند که در نتیجه آن میزان GVHD آن‌ها کاهش می‌یابد. دلیل این تفاوت در نتایج کاملاً روشن نیست با این حال تفاوت بودن فراوانی این پلی مورفیسم‌ها در جمعیت‌های مختلف، متفاوت بودن رژیم‌های سرکوب‌گر سیستم ایمنی که در طی پیوند به کار برده می‌شود، در نظر گرفتن درجه‌های مختلف GVHD در مطالعه‌های مختلف همین طور متفاوت بودن احتمال وقوع GVHD در جمعیت‌های مختلف می‌تواند از دلایل این اختلاف باشد (۱۲).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، ارتباط معناداری بین وجود پلی مورفیسم‌های ۸، ۱۲ و ۱۳ در ژن NOD2 با وقوع GVHD حاد و مزمن یافت نشد. با توجه به تناقضاتی که در نتایج مطالعه‌های انجام‌شده توسط محققین مختلف مشهود است، مطالعه‌های بیشتر بر روی جمعیت‌های بزرگ‌تر و همین طور در سایر لوسمی‌ها جهت نتیجه‌گیری قطعی ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه پلی مورفیسم‌های ۸، ۱۲ و ۱۳ مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به این که انواع SNP دیگر در این ژن شناسایی شده است، می‌توان تاثیر این پلی مورفیسم‌ها را نیز مورد بررسی

پلی مورفیسم‌ها در جمعیت گیرنده و اهداکننده یکسان (۱۲/۱٪) به دست آمد و چون در ۳ جفت از زوج‌های پیوندی، هم اهداکننده و هم گیرنده دارای پلی مورفیسم بودند (۲/۴٪)، در مجموع ۲۱/۸٪ از ۱۲۴ زوج پیوندی دارای یکی از پلی مورفیسم‌های جهش یافته بودند. فراوانی ۱۲/۱٪ این پلی مورفیسم‌ها در جمعیت اهداکننده و گیرنده، با نتایج سایر مطالعاتی که بر روی جمعیت سفید پوست به دست آمده هم‌خوانی داشت (۵). در این مطالعه تاثیر وجود پلی مورفیسم‌های یاد شده هم به صورت مجزا در اهداکننده و گیرنده و هم در حالتی که یکی از زوج‌های پیوندی دارای پلی مورفیسم بودند بررسی شد و ارتباط معناداری بین وجود پلی مورفیسم‌ها و وقوع GVHD حاد و مزمن در هیچ موردی به دست نیامد.

در مطالعه‌های مختلف، نتایج متفاوتی در مورد این ارتباط گزارش شده است. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با آنچه توسط صیرفی و همکارانش گزارش شده هم‌خوانی دارد. مطالعه آن‌ها بر روی ۱۹۶ بیمار تحت پیوند آلوژن انجام شد و در مجموع یکی از سه پلی مورفیسم در ۱۹ درصد از زوج‌های پیوندی شناسایی شد. وجود پلی مورفیسم‌ها تاثیری در GVHD نداشت (۱۲). پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی NOD2 در ۱۴ درصد از اهداکنندگان و ۱۷ درصد از ۳۹۰ بیماری که توسط آن گوین مطالعه شدند شناسایی شد. این بیماران تحت پیوند آلوژن از دهنده‌های غیر خویشاوند و با HLA سازگار قرار گرفته بودند و ارتباطی بین پلی مورفیسم‌ها و GVHD حاد و مزمن یافت نشد (۱۳). در مطالعه نیمه و همکاران که بر روی ۱۹۶ بیمار مبتلا به لوسمی حاد و اهداکنندگان کاملاً شبیه غیر خویشاوند آن‌ها انجام شد نیز، ارتباط واضحی بین وجود پلی مورفیسم‌ها با GVHD یافت نشد (۱۰). همین طور در مطالعه گرامل بر روی ۸۵ بیمار تحت پیوند آلوژن نیز بین GVHD حاد و مزمن با پلی مورفیسم ژن NOD2 ارتباط وجود نداشت (۸).

برخی مطالعه‌ها، ارتباط معناداری بین وقوع GVHD حاد و مزمن و پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن NOD2 گزارش کرده‌اند. در مطالعه هولر بر روی ۱۶۹ بیماری که تحت پیوند از اهداکنندگان خویشاوند و غیر

قرار داد.

بنیادی به خاطر تخصیص بودجه کمال تشکر را داریم. بدین‌وسیله تقدیر و تشکر خود را از همکاران آزمایشگاه و بخش‌های پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی اعلام می‌داریم.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های

References :

- Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379(6568): 772-3.
- Penack O, Holler E, van den Brink MR. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* 2010; 115(10): 1865-72.
- Lener MR, Oszutowska D, Castaneda J, Kurzawski G, Suchy J, Nej-Wołoskiak K, *et al.* Prevalence of the NOD2 3020insC mutation in aggregations of breast and lung cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 95(2): 141-5.
- Elmaagacli AH, Koldehoff M, Hindahl H, Steckel NK, Trenchel R, Peceny R, *et al.* Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation* 2006; 81(2): 247-54.
- Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Herfarth H, Greinix H, *et al.* Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 2006; 107(10): 4189-93.
- Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Greinix H, Dickinson AM, *et al.* The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GVHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet* 2008; 35 (4-5): 381-4.
- Hildebrandt GC, Granell M, Urbano-Ispizua A, Wolff D, Hertenstein B, Greinix HT, *et al.* Recipient NOD2/CARD15 variants: a novel independent risk factor for the development of bronchiolitis obliterans after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14(1): 67-74.
- Granell M, Urbano-Ispizua A, Aróstegui JI, Fernández-Avilés F, Martínez C, Rovira M, *et al.* Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91(10): 1372-6.
- Mayor NP, Shaw BE, Hughes DA, Maldonado-Torres H, Madrigal JA, Keshav S, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors. *J Clin Oncol* 2007; 25(27): 4262-9.
- Mayor NP, Shaw BE, Keshav S, Madrigal JA, Marsh SG. A novel technique for NOD2/CARD15 genotyping using PCR-SSP. *J Immunol Methods* 2007; 327(1-2): 82-7.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, *et al.* 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15(6): 825-8.
- Sairafi D, Uzunel M, Remberger M, Ringdén O, Mattsson J. No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41(11): 961-4.
- Nguyen Y, Al-Lehibi A, Gorbe E, Li E, Haagenon M, Wang T, *et al.* Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease-associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation. *Blood* 2010; 115(17): 3625-31.

Original Article

Evaluation of the association of NOD2 gene polymorphisms with the occurrence of GVHD in acute myelogenous leukemia patients

Rostami Sh.¹, Ahmadi Nia L.², Ghaderi B.¹, Mousavi S.A.¹, Abroun S.³, Hajihoseini R.²,
Chahardouli B.¹, Ghadimi H.¹, Shamshiri A.R.¹, Ghavamzadeh A.¹, Alimoghaddam K.¹

¹Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Payame Noor University, Tehran, Iran

³Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Graft-versus-host disease (GVHD) is one of life-threatening post-transplantation complications. Several recent studies have described a significant correlation between transplantation outcome and three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the NOD2 gene. This study was conducted to evaluate the association of NOD2 gene polymorphisms with the occurrence of GVHD in acute myelogenous leukemia patients who underwent HSCT from their HLA-matched sibling donors.

Materials and Methods

We examined retrospectively NOD2 genotypes by PCR-SSP both in 124 patients who underwent HSCT and in their donors; then, the association of the genetic polymorphisms on acute and chronic GVHD was evaluated. Median follow up of patients was 40 months (range of 28-77 months). Statistical analyses were performed using Chi-square test and SPSS software.

Results

Mutation incidence were the same between donors and recipients as 12.1%. In three of the patient-donor pairs (2.4%) SNPs occurred in both resulting in an overall frequency of 21.8% in patient-donor pairs. There weren't any significant differences between aGVHD and cGVHD incidence rates when donor/recipient pairs with SNPs were compared with the pairs without SNPs. aGVHD and cGVHD incidence rates in the former pairs were 52% and 56% and in the latter pairs 50.5% and 55%, respectively.

Conclusions

No impact of NOD2 SNPs on incidence of acute and chronic GVHD was observed. Further studies are required to ascertain whether the findings of this study can be extended to other disease groups. In addition, further studies are required to identify the relevance of other SNPs.

Key words: Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Graft vs Host Disease, PCR
Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(3): 148-155

Received: 8 Jan 2010

Accepted: 3 Aug 2010

Correspondence: Alimoghaddam K., Hemato-Oncologist. Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Tehran University of Medical Sciences.
P.O.Box: 14114, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88029390; Fax: (+9821) 88004140
Email: alimgh@ams.ac.ir