

مطالعه پلیمورفیسم COX-2-765G → C در بیماران میگرنی

اللهه مظفری^{*}، عباس دوستی^۱، رضا نعمتی^۲، مصطفی فغانی^۳، مرتضی مخلوعی^۴

چکیده

مقدمه: میگرن یک سردرد ناتوان کننده رایج با حملات درد برگشت‌پذیر است که با تغییرات موقتی قطر رگ‌های خونی سر ارتباط دارد بر اساس تقسیم‌بندی جهانی جامعه بین‌المللی سردرد، مبتلایان به میگرن به دو گروه عمدۀ با اورا و بدون اورا دسته‌بندی می‌شوند. این پژوهش با هدف بررسی ارتباط پلیمورفیسم ژنتیکی COX-2-765G → C و خطر ابتلا به میگرن در دو گروه بیمار و کنترل انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه DNA مربوط به بافت خونی ۱۰۰ بیمار میگرنی و ۱۰۰ فرد سالم استخراج و خالص‌سازی گردید. با استفاده از پرایمر اختصاصی (rs20417) COX-2-765G → C در فرآیند PCR، ناحیه مورد نظر ژن COX-2 تکثیر داده شد. سپس با به‌کارگیری روش RFLP و آنزیم محدود‌گر AcI، هضم آنزیمی صورت گرفت و داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: فراوانی ژنتیپ‌های CC, COX-2-765 GC, COX-2-765 به طور معنی‌داری در بیماران نسبت گروه کنترل بالاتر است.

نتیجه‌گیری: پلیمورفیسم COX-2-765G → C میتواند خطر ابتلا به میگرن را افزایش دهد. با این وجود لازم است مطالعات بیشتری بر روی نمونه‌های گسترده‌تر با نژادهای مختلف در دیگر مناطق دنیا صورت گیرد تا نقش واریانت‌های ژن COX-2 در پیشبرد بیماری میگرن مشخص شود.

واژه‌های کلیدی: میگرن، ژنتیک، پلیمورفیسم، ژن COX-2

۱- دانشجویی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، چهارمحال و بختیاری، ایران

۲- استادیار گروه ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، چهارمحال و بختیاری، ایران

۳- استادیار گروه نورولوژی، مرکز تحقیقات خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، بوشهر، ایران

۴- استادیار گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، چهارمحال و بختیاری، ایران

۵- دانشجویی کارشناسی ارشد مهندسی متابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بوشهر، بوشهر، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن، ۰۹۱۷۳۱۶۹۶۹۹، پست الکترونیکی: elaheshsea@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۳ تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۸

مقدمه

که در خصوص تأثیر عوامل ژنتیکی در این بیماری می‌توان از میگرن همی‌پلزیک خانوادگی یاد کرد(۲۰).

پژوهش‌ها مشخص کرده‌اند که همه آنزیم‌های COX از لحاظ ساختمانی، ساختار اولیه مشابهی داشته(۲۱) و اندازه‌ای حدود ۶۰۰ آمینو اسید دارند(۲۲). نتیجه پژوهش‌های سال ۲۰۰۴ میلادی نشان داد، مهم‌ترین خصوصیات مقایسه‌ای دو ایزوفرم ژن COX از جمله موقعیت ژنی عنوان کرده که COX-2 ۹q32-q33.3 بر روی ۱q25.2-25.3 است و هر دوی آنها از لحاظ تعدادنخسته(Copy Number)، منفرد(Single) هستند. اندازه ژنی آنها به ترتیب ۱۲ و ۸ kb و تعداد اگزون‌ها نیز در مورد COX-1، ۱۰ و در مورد COX-2، ۱۱ عدد گزارش شد، در همین مطالعه، تعداد اینترنون‌ها نیز به ترتیب ۱۰ و ۹ عدد ذکر شده است. از طرفی طول mRNA اولیه در ژن COX-1 ۲/۸ kb و در ژن COX-2 ۴/۵ kb است. در این پژوهش، Jarving و همکاران بیان کردند که طول منطقه کد کننده در ژن‌های COX-1 و COX-2، به ترتیب ۱۷۹۷ و ۱۸۱۲ نوكلئوتید و است، که پروموتور COX-1 از نوع TATA-less و پروموتور COX-2 از نوع TATA box می‌باشد. طول پروتئین حاصله از هر کدام، به ترتیب ۵۹۹ و ۶۰۴ آمینواسید گزارش شده و حتی گفته شده از لحاظ تعداد سایت‌های گلیکولیزاسیون نیز با هم متفاوتند، چرا که این تعداد در COX-1، ۳ و در COX-2، بین ۳-۴ متغیر است ولی نشان داده شده که کوفاکتورها و ساختمان چهارم در هر دو مشابه است. کوفاکتورهای هر دو از نوع هم(Heme) و ساختمان چهارم نیز همو دایمر است. از نظر سوبسترا یا پیش ماده واکنش نیز تقریباً یکسان گزارش شده‌اند، با این تفاوت که سوبسترا ای آنزیم COX-2 علاوه بر آرآشیدونیک اسید، اسیدهای دیگر نیز می‌تواند باشد و بالاخره از نظر مقایسه جایگاه سلولی، گفته شده که هر دو در شبکه آندوپلاسمی وجود دارند اما COX-2 می‌تواند علاوه بر شبکه آندوپلاسمی، در پوشش یا

واژه میگرن ۲۵۰۰ سال پیش از لغت یونانی همی‌کرین(Hemicraine) به معنی "نیمی از سر" گرفته شده است(۱). به طور کلی میگرن یک اختلال یا سردرد ناتوان‌کننده(۲) با حملات درد تکرار شونده است(۳) و معمولاً درد آن به صورت ضربانی و یک طرفه بوده(۴) و با انبساط و انقباض قطر عروق خونی سر ارتباط دارد(۵). این بیماری هر دو جنس را تحت تأثیر قرار می‌دهد(۶) ولی شیوع آن در زنان حدود سه برابر مردان است(۷). طبق استانداردهای جامعه بین‌المللی سردرد(International Headache Society)، مدت زمان درد معمولاً بین ۴-۷۲ ساعت گزارش شده(۳) و با علایمی از جمله فوتوفوبی(Photophobia) (حساسیت نسبت به نور)، فونوفوبی(Phonophobia) (حساسیت نسبت به صدا)، تهوع و استفراغ همراه است(۸-۹) و به دو دسته مهم میگرن با اورا(Aura) و بدون اورا تقسیم می‌شود(۱۰). میگرن بالا اورا با علایمی از جمله اورا یا پیش درآمد همراه بوده(۱۱) که شامل علایمی از جمله تغییر حالات و مزاج(Mood changes)، گرفتگی و درد ماهیچه‌های گردن(Neck stiffness)، احساس خستگی و کوفتگی عضلات(Fatigue)(۱۲)، علایم بینایی برگشت‌پذیر مانند مشاهده لکه‌ها، نورهای جرقه زن، احساس گرگز و کرختی در ناحیه پوست بوده(۱۲) و مدت زمان بروز این علایم بین ۵ دقیقه تا ۱ ساعت است(۱۳). چون این عارضه، یک بیماری چند عامله(Multifactorial) بوده، تاکنون نشانه‌های واضح و مشخصی برای تشخیص وضعیت بیماران به دست نیامده است(۱۴). از نظر ژنتیکی، هر دو گروه سابقه‌ای قوی و روشنی دارند(۱۵)، اما طبق یافته‌های اپیدمیولوژیکی اخیر، فاکتورهای ژنتیکی در میگرن با اورا بیشتر از میگرن موثر است(۱۶)، برخی منابع ذکر کرده اند که این نوع از میگرن با حالاتی همراه است(۱۷) که می‌تواند بروز حملات سکته‌های گذرا را تشديد کند(۱۸) و گاهی آن را با انواع بیماری‌های قلبی مرتبط دانسته‌اند(۱۹). از نظر سابقه خانوادگی ۵۰٪ افراد میگرنی، حداقل یک فامیل درجه یک مبتلا به میگرن را دارد

روش بررسی

در این مطالعه، پلیمورفیسم C → COX-2-765 G در ۱۰۰ بیمار میگرنی (۸۰ بیمار زن و ۲۰ بیمار مرد)، به عنوان گروه بیمار و ۱۰۰ فرد سالم (۸۰ داوطلب زن و ۲۰ داوطلب مرد) به عنوان گروه کنترل یا شاهد، مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که افراد گروه بیمار و کنترل از نظر محدوده سنی و جنسی با هم یکسان بودند. افراد این دو گروه از استان بوشهر انتخاب شدند. افراد گروه سالم این مطالعه از بین افراد داوطلب اهدای خون در مرکز انتقال خون استان بوشهر انتخاب شده و بیماران بین آن دسته از افرادی انتخاب شدند که جهت مداوا به کلینیک تخصصی درمانی حضرت ابوالفضل (ع) شهر بوشهر مراجعه کرده و از نظر اطمینان از وضعیت سالم یا بیمار بودن، همه این افراد توسط یک پزشک متخصص نورولوژیست، معاینه و طبق معیارهای گزارش شده توسط IHS، از نظر وجود یا عدم وجود میگرن مورد تأیید قرار گرفتند. سپس همه آنها به پرسشنامه کتبی شامل سوالاتی از جمله جنسیت، محل تولد، نژاد، مذهب، نوع ازدواج والدین، داشتن سردردهای شدید، سن شروع بیماری، سابقه خانوادگی میگرن و غیره پاسخ دادند، پس از کسب رضایت هر فرد، در تابستان و پاییز ۱۳۹۲ از اشخاص مورد مطالعه، در محل سالن‌های خون‌گیری کلینیک تخصصی درمانی حضرت ابوالفضل (ع) و مرکز انتقال خون بوشهر، ۲ میلی لیتر نمونه خون گرفته شد و در تیوب‌های آزمایش استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

افراد گروه کنترل از نظر سابقه بیماری فاقد سردردهای میگرنی بوده و از بین بیماران، افرادی که از سردردهای شبه میگرنی، سردردهای خوشای یا سایر سردردهای حاصل از بیماری‌های روحی و عصبی رنج می‌بردند، حذف شدند. زنان دارای میگرن‌های حاملگی نیز که بیماری آنها ناشی از نوسانات هورمونی در طی دوران بارداری است، از این مطالعه حذف شدند. لازم به ذکر است که ۸۰ نفر از بیماران از میگرن بدون

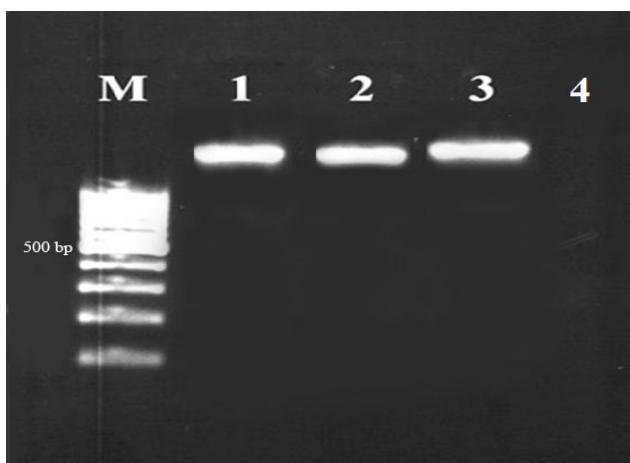
غشای هسته (Nuclear envelope) نیز یافت شود (۲۳). مطالعات نشان داده که پروستاگلاندین‌های سنتز شده به واسطه مسیرهای سیکلواکسیژنات (COX) در پاتوژنیستی (بیماری‌زایی) میگرن در گیرند (۳). گزارش‌های به دست آمده از بررسی‌های انجام شده در سال ۲۰۰۵ میلادی، حاکی از آن است که پروستانوئیدهای سنتز شده به واسطه آراسیدونیک اسید در طی مسیر سیکلواکسیژنات (COX) بهترین واسطه‌ی لیپیدی هستند که منجر به درد شدید در بیماران میگرنی می‌شود (۳). در واقع، پروستانوئیدها که توسط آنزیم‌های سیکلواکسیژنات از ماده اولیه آراسیدونیک اسید سنتز می‌شوند، بهترین واسطه‌های لیپیدی شناخته شده هستند که درد شدید را به دنبال دارند. در میان پروستانوئیدها، پروستاگلاندین E₂ (PGE₂) و PGI₂ (PGI₂)، بیشترین تأثیر را در پردازش سیگنال‌های درد دارند. داروهای غیر استروئیدی ضد التهاب Nonsteroidal Anti Inflammatory Druds (NSAIDs) مثل سالیسیلیک اسید از طریق مهار مسیر COX-1 و COX-2 از تولید پروستانوئیدهایی چون PGE₂ ممانعت کرده و در نتیجه شدت درد را کاهش می‌دهند (۲۴). بنابراین تنظیم سیکل COX-2 در مهار پاتوژنیستی و درمان میگرن شناخته شده است. گزارش‌ها حاکی از این است که پلی مورفیسم پرومومتر C → COX-2-765G می‌توانند رونویسی ژن mRNA و سطوح COX-2 را تغییر داده (۲۵) و در نتیجه بر تولید PGE₂ تأثیر بگذارد (۳، ۲۶).

از آنجایی که طیف وسیعی از جمیعت کشورمان از این بیماری رنج می‌برند و مطالعات ژنتیکی محدودی در این زمینه در دسترس است، سعی شده با انجام این پژوهش بر روی این بیماران، گام مفیدی در زمینه ارتقا دانش ژنتیکی این بیماری برداشته شود. در نتیجه با توجه به تنها تحقیق انجام شده در سال ۲۰۱۳ در ترکیه (۲) در این زمینه و با در نظر گرفتن نقش مهم ژن COX-2 در تولید PGE₂ و پاتوژنیستی میگرن، این مطالعه برای اولین بار در ایران و دومین بار در دنیا، به بررسی پلی‌مورفیسم عملکردی و ارتباط ژن مربوطه با خطر ابتلا به میگرن و تأثیر آن را بر نژاد ایرانی پرداخته است.

جهت تکثیر ژن مورد نظر در افراد تحت مطالعه، پرایمر اختصاصی با کسب اجازه از نویسنده مسئول مقاله^(۳)، مورد سفارش قرار گرفت و سپس به منظور تکثیر قطعه هدف، تمام نمونه های DNA افراد در دستگاه ترمومایکلر (Masterscycler Gradient, Eppendorf) PCR ساخت شرکت اپندورف کشور آلمان متحمل فرایند شدن(جدول ۱).

اورا و ۲۰ نفر نیز از میگرن با اورا رنج می برندند که تشخیص میگرن با اورا و بدون اورا در بیماران نیز توسط پزشک معاینه کننده مورد تایید قرار گرفت.

DNA نهایی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سینا ژن ایران(Catalog Number: DN8115C) طبق دستور العمل شرکت سازنده تخلیص و تازمان مورد نیاز برای استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید. کیفیت DNA تخلیص شده پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۱).



شکل ۱: کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل.

چاهک M مارکر 100 bp، چاهک شماره ۱، ۲ و ۳ نمونه های DNA و چاهک شماره ۴، نمونه فاقد DNA بوده است.

جدول ۱. نام و توالی پرایمر، آنزیم برش دهنده و طول محصول PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	آنژیم محدودگر	طول محصول PCR
COX-2-765G→C (rs20417)	5'-AGG CAG GAA ACT TTA TAT TGG-3' 5'-ATG TTT TAG TGA CGA CGC TTA-3'	AciI	GG: 309 bp CC: 209 bp, 100bp GC: 309bp, 209bp, 100bp

۵ دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۲ چرخه شامل و اسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد برای PCR به COX-2-765G→C (rs20417) مدت یک دقیقه، طویل شدن ابتدایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از اتمام تکثیر قطعه ژن مورد نظر، محصول PCR روی ژل آگارز

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer 10 X ۳/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میلی مolar پرایمر، ۲ میکرومول dNTP، ۲ میلی مolar MgCl₂ و ۱ واحد از آنزیم DNA پلیمراز Tag(شرکت سیناژن- ایران)، به ازای هر نمونه انجام گردید. سپس به منظور جلوگیری از آلودگی و تبخیر، ۱ تا ۲ قطره روغن معدنی استریل به مخلوط واکنش اضافه گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترمومایکلر با شرایط

الکتروفورز مورد رانش قرار گرفته و باندهای ایجاد شده با نور ماورای بنفش مشاهده و با دستگاه ژل داکیومنتیشن عکسبرداری و ثبت گردیدند(شکل ۳).



شکل ۳: نتایج هضم آنزیمی و مشاهده قطعات برش خورده توسط آنزیم *AciI* بر روی ژل آگارز ٪/۲.

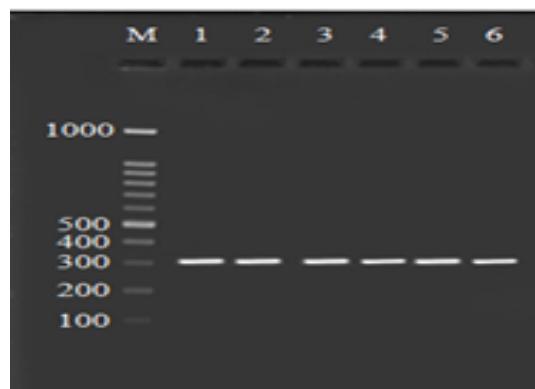
چاهک M، مارکر 100 bp، چاهک ۱ و ۲، DNA های دارای پلی مورفیسم هتروزیگوت(GC)، ایجادکننده قطعات با سایز های 309bp ۳۰۹، 209bp ۲۰۹، چاهک شماره ۳ و ۶ DNA نرمال بدون پلی مورفیسم(GG) دارای سایز باند نرمال 309. چاهک شماره ۴ و ۵، مورفیسم دارای پلی مورفیسم هموزیگوت (CC) ایجاد کننده قطعات با سایز های 209 و 100bp ۱۰۰.

داده های به دست آمده با استفاده نرم افزار SPSS از نسخه ۲۰ و آزمون های آماری مربع کای، آنالیز واریانس(ANOVA) و دقیق فیشر تجزیه و تحلیل گردید. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ p در نظر گرفته شد.

نتایج

فراآنی ژنوتیپ COX-2-765GG به طور قابل توجهی در گروه کنترل نسبت به گروه بیماران بالاتر بود (۵۲٪ در گروه کنترل نسبت به ۱۸٪ در بیماران $p < 0/001$ و $\chi^2 = 34/03$). همچنین با توجه به فزوئی فراآنی ژنوتیپ های COX-2-765GC و COX-2-765CC در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل (به ترتیب $p < 0/001$ و $p < 0/001$) می توان نتیجه گرفت که این ژنوتیپ ها خطر ابتلا به بیماری را بالا می برنند. فراآنی همین ژنوتیپ در بیماران میگرنی با اورا نسبت به گروه بدون اورا، ۷ در برابر ۱۱، یعنی ۳۵٪ در برابر ۱۳٪ بود که پس از مقایسه هر دو گروه بیمار با افراد سالم، مشاهده شد

۱/۵ درصد متشكل از ۵٪ میکرو گرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید در بافر TBE 1X (محلول حاوی ۸٪ گرم باز تریس، ۵٪ گرم بوریک اسید و ۴ میلی لیتر EDTA)، ابتدا با ولتاژ ۱۱۰ ولت به مدت ۲ دقیقه و سپس با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۱۵ دقیقه در تانک الکتروفورز، تحت عمل رانش قرار گرفتند. پس از مشاهده نتایج توسط دستگاه doc UV، محصولات حاوی قطعه مورد نظر (قطعه دارای سایز ۳۰۹ جفت بازی) انتخاب و محصولات قادر قطعه دلخواه، حذف شده و جهت انجام مجدد واکنش زنجیره ای پلیمراز، دوباره تحت عمل PCR قرار گرفتند. در نهایت تکرار آزمایش ها منجر به تکثیر و انجام صحیح این واکنش بر روی همه نمونه ها گردید (شکل ۲).



شکل ۲: مشاهده قطعات ۳۰۹ جفت بازی. انجام PCR توسط برایمر COX-2-765G → C (rs20417).
چاهک M، مارکر 100 bp fermentase و چاهک های شماره ۱-۶، قطعات ۳۰۹ جفت بازی ژنوتیپ GG.

پلی مورفیسم طول قطعه محدود کننده (RFLP Length Polymorphism) برای هضم آنزیمی محصول با روش RFLP، از آنزیم اندونوکلئاز محدود الاثر *AciI* استفاده شد (۳). که توالی اختصاصی C|CGC رشته های DNA را شناسایی و قطع می کند، استفاده شد (جدول ۱). به این صورت که ۲ میکرولیتر از آنزیم برش دهنده در ۲ میکرولیتر بافر اختصاصی آنزیم با ۲۰ میکرولیتر محصول PCR مخلوط کرده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام مدت زمان مذکور، محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه، در تانک

ملاحظه و معنی داری نبود($P<0.084$) و $\chi^2=4/95$. همچنین مشخص شد فراوانی ژنتیپ COX-2-765CC و COX-2-765GC در بیماران بالاتر از گروه کنترل بود (به ترتیب $\%35$ و $\%47$ در بیماران و $\%40$ و $\%47$ در گروه کنترل، $P<0.001$ و $P<0.001$). به نظر می رسد که COX-2-765G خطر ابتلای به میگرن را کاهش و COX-2-765C+ خطر ابتلای به این بیماری را افزایش می دهد(جدول ۲).

که، تفاوت قابل ملاحظه ای وجود دارد و می توان نتیجه گرفت که ژنتیپ نرمال(GG) در مقایسه با ژنتیپ موتانت(CC) در استعداد ابتلا به هر دو نوع میگرن(با اورا و بدون اورا) تأثیر معکوس دارد($P<0.018$ و $\chi^2=8/83$ برای گروه MA و $P<0.001$ و $\chi^2=36/83$ برای گروه MO). از طرفی سطح معنی داری برای میزان فراوانی این ژنتیپ در بین خود دو گروه بیمار نیز محاسبه گردید اما نتیجه مقایسه بین دو گروه، تفاوت قابل

جدول ۲: فراوانی شیوع ژنتیپ های COX-2-1195A → G و COX-2-765G → C در بیماران و گروه کنترل

P-Value4	P-Value3	P-Value2	P-Value1	N:۱۰۰	کل بیماران		MO	گروه شاهد N:۲۰	گروه MA N:۱۰۰	گروه شاهد / آلل COX-2 765GC			
					تعداد (درصد)	تعداد (درصد)							
۰/۰۰۱	۰/۰۸۴	۰/۰۰۱	۰/۰۱۸	(۴۷)	۱۸	(۱۸)	(۱۳/۸)	۱۱	(۳۵)	۷	(۵۲)	۵۲	GG
				(۳۵)	۳۵	(۳۵)	(۳۶/۲)	۲۹	(۳۰)	۶	(۸)	۸	CC
				(۵۸/۵)	۱۱۷	(۶۱/۲)	(۶۱/۲)	۹۸	(۴۷/۵)	۱۹	(۴۰)	۴۰	GC
				(۴۱/۵)	۸۳	(۳۸/۷)	(۳۸/۷)	۶۲	(۵۲/۵)	۲۱	(۲۸)	۵۶	C allele
۰/۰۰۱	۰/۱۱۴	۰/۰۰۱	۰/۰۱۵	(۸۲)	۸۲	(۸۶/۲)	(۸۶/۲)	۶۹	(۶۵)	۱۳	(۷۲)	۱۴۴	G allele
۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵۲	۰/۰۰۱	(۶۵)	۶۵	(۶۳/۷)	(۶۳/۷)	۵۱	(۷۰)	۱۴	(۴۸)	۴۸	C+(CC+CG)
۰/۰۳۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱						(۹۲)	۹۲			G+(GG+CG)

P1 : سطح معنی داری بین گروه بیماران میگرنی با اورا در مقایسه با گروه کنترل.

P2: سطح معنی داری بین گروه بیماران میگرنی بدون اورا در مقایسه با گروه کنترل.

P3: سطح معنی داری بین گروه بیماران میگرنی با اورا در مقایسه با گروه بیماران میگرنی بدون اورا.

P4: سطح معنی داری بین کل گروه بیماران در مقایسه با کل گروه کنترل.

دارای ارزش معنی داری بود($P<0.05$), همانطور که در جدول ۲ مشخص است، فراوانی آلل G(آلل نرمال) در گروه شاهد نسبت به آلل C(آلل جهش یافته) بیشتر و به صورت ۱۴۴ به ۵۶ بوده و در مقابل فراوانی همین دو آلل در کل بیماران به صورت ۸۳ به ۱۱۷ می باشد که این نشان دهنده ارتباط مستقیم آلل موتانت(C) با بیماری مورد نظر است.

بحث و نتیجه گیری

گزارش های برآمده از بررسی های Bresalier و همکاران، نشان می دهد که پروستانوئیدهایی که به واسطه آرشیدونیک اسید

از سوی دیگر فراوانی ژنتیپی COX-2-765G → C در دو گروه بیماران MA و MO و گروه شاهد به طور جداگانه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فراوانی ژنتیپ COX-2-765CC به طور قابل ملاحظه ای در بیماران MA و MO نسبت به افراد سالم بیشتر بود($P<0.018$ و $P<0.001$ و $\chi^2=8/83$ و $\chi^2=36/83$). در این مقایسه نیز تفاوت معنی دار و قابل قبول است(جدول ۲). همچنین فراوانی آللی C و G برای گروه شاهد، بیماران MA، بیماران MO و کل بیماران بطور دقیق محاسبه گردید و فراوانی آلل C گروه های بیماران و کنترل،

(COX-2-1195A>G, -765G>C, -8473T>C) و احتمال وقوع این بیماری ارائه شد^(۳۴) که این نتیجه نیز مشابه نتایج این تحقیق است. با ذکر این نکته که بین یافته‌های مطالعه حاضر و این مطالعات، تفاوت در بررسی نوع بیماری و تعداد پلیمورفیسم‌های مورد آزمایش است. تحقیقاتی که در سال‌های ۲۰۰۰ و ۲۰۱۲ میلادی که بر روی سلول‌های توموری پروستات صورت گرفت^(۳۵)، نشان دادند که افزایش بیان این ژن، باعث رشد و پیشرفت سلول‌های توموری در افراد مبتلا به این بیماری می‌گردد^(۳۶). بر اساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ میلادی، بر روی یک جمعیت ایرانی انجام گرفت، مشخص شد که بین پلیمورفیسم ژنی C-765G>COX-2 مشخص شد که این پلیمورفیسم با وجود ندارد^(۳۷) اما مشابه سلطان روده، ارتباط معنی‌داری وجود ندارد^(۳۷) اما مشابه همین مطالعه که در سال ۲۰۱۳ میلادی بر روی بیماران دانمارکی انجام شد و مشخص گردید که این نوع پلیمورفیسم شناس ابلا به بیماری نام بده را افزایش می‌دهد^(۳۸)، در این جا نیز از نظر مقایسه پلیمورفیسمی با پژوهش‌های صورت گرفته، شباهت زیادی قابل مشاهده است اما از نظر نوع بیماری مورد مطالعه و نتیجه به دست آمده، تفاوت دیده می‌شود. اطلاعات موجود در مورد نقش ژن COX-2 بیان می‌کنند که اختلال بیانی این ژن باعث بروز اشکال در سلول‌های عصبی، اختلالات نورولوژیکی، بیماری‌های قلبی و آلزایمر می‌گردد^(۳۹) که در مقایسه این پژوهش‌ها با مطالعه حاضر، اختلاف در نوع بیماری و روش کار به چشم می‌خورد. از طرف دیگر، ژن مورد نظر و ارتباط مستقیم آن با بیماری‌های مورد مطالعه، وجه اشتراک این مطالعات است. طبق اولین مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۳ میلادی، که توسط محققان ترکیه‌ای صورت گرفت، مشخص شد که بین پلیمورفیسم C → COX-2-765G و شناس ابلا به میگرن ارتباط مستقیم و معنی‌داری وجود دارد، به طوری که فراوانی افراد حامل ژنتیپ COX-2-765C+ در گروه بیماران بسیار بیشتر از گروه شاهد است^(۳۰). در ۹۷/۹٪ در گروه بیمار نسبت به ۸۸/۶٪ در گروه شاهد، که نتیجه به دست آمده در مطالعه حاضر از نظر کیفی با این نتایج هم پوشنایی دارد^(۳۵) در گروه بیمار و ۸٪ در افراد غیربیمار. علاوه بر این، فراوانی دو

سنتر می‌شوند، بهترین واسطه لیپیدی هستند که در طی مسیر سیکلواکسیژناز(COX) منجر به احساس درد شدید می‌شوند^(۳۴). بنابراین تنظیم سیکل سیکلواکسیژناز بواسطه سالیسیلیک اسیدها در مهار پاتوژنی و درمان میگرن مهم است، Desdemir و همکاران گزارش کرده‌اند که بین پلیمورفیسم COX-2-765G → C و خطر ابتلا به میگرن، ارتباط معنی‌داری وجود دارد^(۳) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد. مطالعه‌ای دیگر که به بررسی ارتباط پلیمورفیسم‌های ژن COX-2 و سلول‌های توموری مری پرداخته است، سه پلیمورفیسم معرفی شده که بین واریانت COX-2-765G → C و هدف مطالعه حاضر نقطه مشترکی به چشم می‌خورد^(۳۷). در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ میلادی نیز، نتایج جالب توجهی مبنی بر اینکه افزایش بیش از حد بیان ژن COX-2 با بروز تومور مغزی ارتباط مستقیم دارد، منتشر شد^(۲۸-۲۹) که نوع بیماری و روش کار این دو مطالعه با مطالعه حاضر، متفاوت بوده اما ژن مورد بررسی، در هر دو مطالعه یکسان بوده است. تحقیقات Lopez و همکاران در سال ۲۰۰۹ میلادی مشخص شده که افراد حامل پلیمورفیسم‌های ژن COX-2، مستعد بیماری Sarcoidosis می‌باشند^(۳۰)، در این مقایسه نیز، تفاوت فقط مربوط به نوع بیماری بوده و بین روش کار، ژن مورد مطالعه و تأثیر در خطر ابتلا به بیماری تفاوتی دیده نمی‌شود. از دیگر پیامدهای پلیمورفیسم‌های این ژن، ایجاد درد شدید در سلول‌های عصبی بوده که با وقوع درد میگرن ارتباط مستقیم دارد^(۳۱) و از این لحاظ با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه دیگری، با همین روش شناس ابلا به سرطان ریه را نیز بالا می‌برد^(۳۲). همچنین بر اساس نتایج مطالعاتی مشابه که به ترتیب در ایران انجام شد، دیده شد که بیان این ژن از جمله بیماری Vitilgio که یک بیماری سیستم ایمنی است را بالا می‌برد^(۳۳). در رابطه با همین موضوع، مطالعه‌ای در چین در مورد پلیمورفیسم‌ها

با تمرکز بر این موارد، بتوان به ارتباط قابل توجهی بین آنها دست یافت. همچنین از آنجایی که یکی از پیامدهای پلیمورفیسم، اختلال در سطوح رونویسی و بیان ژن مربوطه می‌باشد، مطالعات بیشتری در زمینه چگونگی بیان ژن COX-2 در بیماران میگرنی مفید و ضروری است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به شماره ۹۱۰۸۵۰۷۰۷ از بدینوسیله نویسندها مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلینیک تخصصی درمانی حضرت ابوالفضل (ع) شهر بوشهر، معاونت پژوهشی سازمان انتقال خون استان بوشهر و همچنین اعضای محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، به دلیل همکاری‌های اجرایی به عمل می‌آورند.

ژنوتیپ COX-2-765GC و COX-2-765CC در گروه بیماران بالاتر از افراد غیربیمار بوده است(۳). در اینجا نیز نتایجی که در بررسی‌های صورت گرفته به دست آمد، از نظر کیفی با نتایج حاصله در مطالعه نام برد هم راستا بود. به طور کلی، نتایج نشان می‌دهد که پلیمورفیسم ژن C → COX-2-765G، خطر ابتلا به بیماری میگرن را افزایش می‌دهد. نتایج به دست آمده در این تحقیق به عنوان دومین پژوهش، تاییدی بر یافته‌های مطالعه قبلی می‌باشد. با دریافت این نتایج از مطالعات و بررسی‌های ژنتیکی میگرن لازم است مطالعات بیشتری بررسی دیگر نژادها در مناطق با شرایط اقلیمی متفاوت و تعداد نمونه‌های بیشترتر صورت گیرد. با توجه به این نکته که میگرن بیشتر افراد میان سال خصوصاً زنان را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین تلاش محققان نیز باید بیشتر بر روی این دسته از افراد و ژن‌های موجود بر روی کروموزوم X متمرکز شود، امید است

References:

- 1- Evans R. *Migraine: a question and answer review*. Med Clin North Am 2009; 93(2): 245-62.
- 2- Chasman DI, Schürks M, Anttila V, de Vries B, Schminke U, Launer LJ, et al. *Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population*. Nat Genet 2011; 43(7): 695-98.
- 3-. Dasdemir S, Cetinkaya Y, Gencer M, Ozkok E, Aydin M, Cakmakoglu B. *Cox-2 gene variants in migraine*. Gene 2013; 518(2): 292-95.
- 4- Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari M.D. *Migraine-current understanding and treatment*. N Engl J Med 2002; 346(4): 257-70.
- 5- McCrary D, McClain D, Criscuolot CL. *The molecular genetics of migraine headaches and their catalytic nature towards strokes*. Stroke; 2001.
- 6- Kara I, Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kilic G. *Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk*. Brain Res Mol Brain Res 2003; 111 (1-2): 84-90.
- 7- Lipton RB, Bigal ME, Diamond M, Freitag F, Reed ML, Stewart WF, et al. *Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy*. Neurology 2007; 68(5): 343-49.

- 8- Kelman L, Tanis D. *The relationship between migraine pain and other associated symptoms*. Cephalgia 2006; 26(5): 548-53.
- 9- Freilinger T, Anttila V, de Vries B, Malik R, Kallela M, Terwindt GM, et al . *Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura*. Nat Genet 2012; 44(7): 777-82.
- 10- Mulder EJ, Van Baal C, Gaist D, Kallela M, Kaprio J, Svensson DA, et al. *Genetic and environmental influences on migraine: a twin study across six countries*. Twin Res 2003; 6(5): 422-31.
- 11- Russel MB, Gevril M ,Ulrich V, Kaprio J, Olesen J. *Genetic and Environmental factors in migraine*. Neurology 1999; 53(19): 995–99.
- 12- Cutrer FM, Huerter K. *Migraine aura*. Neurologist 2007; 13(3): 118-25.
- 13- Gasparini CF, Sutherland HG, Griffiths LR. *Studies on the pathophysiology and genetic basis of migraine*. Curr Genomics 2013; 14(5): 300-15.
- 14- Bigal ME, Ashina S, Burstein R, Reed ML, Buse D, Serrano D, et al. *Prevalence and characteristics of allodynia in headache sufferers: a population study*. Neurology 2008; 70(17): 1525-33.
- 15- Eising E, de Vries B, Ferrari MD, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM. *Pearls and pitfalls in genetic studies of migraine*. Cephalgia 2013; 33(8): 614-25.
- 16- Todt U, Dichgans M, Jurkat-Rott K, Heinze A, Zifarelli G, Koenderink JB, et al. *Rare missense variants in ATP1A2 in families with clustering of common forms of migraine*. Hum Mutat 2005; 26(4): 315-21.
- 17- Eikermann-Haerter K, Lee JH, Yuzawa I, Liu CH, Zhou Z, Shin HK, et al. *Migraine mutations increase stroke vulnerability by facilitating ischemic depolarizations*. Circulation 2012; 125(2): 335-45.
- 18- Kurth T, Chabriat H, Bousser MG. *Migraine and stroke: a complex association with clinical implications*. Lancet Neurol 2012; 11(1): 92-100.
- 19- Butt JH, Franzmann U, Kruuse C. *Endothelial function in migraine with aura- a systematic review*. Headache 2015; 55(1):35-54.
- 20- Griffiths LR, Nyholt DR, Curtain RP, Goadsby PJ, Brimage PJ. *Migraine association and linkage studies of an endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene polymorphism*. Neurology 1997; 49(2): 614-17.
- 21- Simmons DL, Botting RM, Hla T. *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. Pharmacol Rev 2004; 56(3): 387-437.
- 22- Garavito RM, Malkowski MG, DeWitt DL. *The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and-2*. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002; 68-69: 129-52.
- 23- Jarving R, Jarving I, Kurg R, Brash AR, Samel N. *On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isozymes: characterization of marine invertebrate COX genes points to independent duplication events in vertebrate and invertebrate lineages*. J Biol Chem 2004; 279(14): 13624-33.

- 24- Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. *Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial.* N Engl J Med 2005; 352(11): 1092-102.
- 25- Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, et al. *Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer.* Gastroenterology 2005; 129(2): 565-76.
- 26- Sanak M, Szczeklik W, Szczeklik A. *Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandins production in bronchial asthma.* J Allergy Clin Immunol 2005; 116(1): 221-23.
- 27- Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. *Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for esophageal squamous cell carcinoma.* Mutat Res 2009; 663(1-2): 52-59.
- 28- Cetin M, Buyukberber S, Demir M, Sari I, Sari I, Deniz K, et al. *Overexpression of cyclooxygenase-2 in multiple myeloma: association with reduced survival.* Am J Hematol 2005; 80(3): 169-73.
- 29- Trojan A, Tinguey M, Vallet S, Seifert B, Jenni B, Zippelius A, et al. *Clinical significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) in multiple myeloma.* Swiss Med Wkly 2006; 136(25-26): 400-3.
- 30- Lopez-Campos JL, Rodriguez-Rodriguez D, Rodriguez-Becerra E, AlfagemeMichavila I, Guerra JF, Hernandez FJ, et al. *Cyclooxygenase-2 polymorphisms confer susceptibility to sarcoidosis but are not related to prognosis.* Respir Med 2009; 103(3): 427-33.
- 31- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, et al. *Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity.* Nature 2001; 410(6827): 471- 75.
- 32- Campa D, Zienoldiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. *Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer.* Carcinogenesis 2004; 25(2): 229-35.
- 33- Esmaeili B, Rezaee SA, Layegh P, TavakkolAfshari J, Dye P, GhayoorKarimiani E, et al. *Expression of IL-17 and COX2 gene in peripheral blood leukocytes of vitiligo patients.* Iran J Allergy Asthma Immunol 2011; 10(2): 81-89.
- 34- Li M, Gao Y, Li C, Liu L, Li K, Gao L, et al. *Association of COX2 functional polymorphisms and the risk of vitiligo in Chinese populations.* J Dermatol Sci 2009; 53(3): 176-81.
- 35- Fujita H, Koshida K, Keller ET, Takahashi Y, Yoshimoto T, Namiki, M, et al. *Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression.* Prostate 2002; 53(3): 232-40.
- 36- Kirschenbaum A, Klausner AP, Lee R, Unger P, Yao S, Liu XH, et al. *Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate.* Urology 2000; 56(4): 671-76.

- 37- Daraei A, Salehi R, Mohamadhashem F. *PTGS2 (COX2) -765G>C gene polymorphism and risk of sporadic colorectal cancer in Iranian population*. MolBiol Rep 2012; 39(5): 5219-24.
- 38- Andersen V, Holst R, Kopp TI, Tjønneland A, Vogel U. *Interactions between diet, lifestyle and IL10, IL1B, and PTGS2/COX-2 gene polymorphisms in relation to risk of colorectal cancer in a prospective Danish case-cohort study*. PLoS One 2013; 8(10)
- 39- Oka A, Takashima S. *Induction of cyclo-oxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurones and axons*. Neuroreport 1997; 8(5): 1161-64.

Evaluating COX-2-765 G →C Genetic Polymorphism in Migraineurs

**Mozaffari E (MSc Student)^{*1}, Doosti A (PhD)², Nemati³ R (Phd), Faghani M (Phd)⁴,
Makhlooei M (MSc Student)**

Received: 8 Jan 2015

Accepted: 23 Apr 2015

¹Department of Genetic, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Kohgiluye and Boyer-Ahmad, Iran

^{2,4}Department. of Genetic Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Kohgiluye and Boyer-Ahmad, Iran

³Department. of Neurology, Boushehr University of Medical Sciences , Boushehr, Iran

⁵Department of Agriculture Engineering, Islamic Azad University, Boushehr Branch, Boushehr, Iran

Abstract

Introduction: Migraine is a common debilitating headache with reversible pain attacks associated with temporal changes in the diameter of head blood vessels. According to the International Classification for the Headache Society, migraineurs are divided into two main categories: migraine with aura and migraine without aura. The present study aimed to investigate the association between COX-2-765G →C genetic polymorphism and the risk of migraine.

Methods: In this study, genomic DNAs related to the blood tissues of 100 migraine patients and 100 controls were extracted and purified. The expected region of COX-2 gene was amplified utilizing the appropriate COX-2-765G→C (rs20417) primer in the PCR process. Then, the enzyme digestion was performed using RFLP manner and Aci I restriction enzyme. Moreover, the SPSS software (version 20) was applied in order to analyze the study data.

Results: The study results revealed that the frequency of the COX-2-765CC and COX-2-765CG genotypes in migraine cases were significantly higher than those of controls.

Conclusion: The study findings demonstrated that COX-2-765G→C polymorphism can increase the risk of migraine susceptibility. However, further studies are necessitated to be conducted on larger samples in different nations in other parts of the world in order to assess the role of COX-2 gene variants in the migraine development.

Keywords:Cox-2 gene; Genetic; Migraine; Polymorphism

This paper should be cited as:

Mozaffari E, Doosti A, Nemati, Faghani M, Makhlooei M. **Evaluating cox-2-765 g →c genetic polymorphism in migraineurs.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 20015; 23(5): 452-63.

*** Corresponding author: Tel: 09173169699, E-mail: elahesh@ yahoo.com**