تشخیص DAN ژنومی کلامید یاپنومونیه در پلاک‌های آترواسکلروتیک عروق کرونر به وسیله روش PCR

گیتا اسلامی Ph.D.☆، سید مهدی بوترابی M.D.☆♦، بهرام کاظمی Ph.D.★
حسین گودرزی Ph.D.☆، فاطمه فلاح Ph.D.☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

آزمایشگاه بیولوژی مولکولی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۲۷۱۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

چکیده

* **هدف**: تشخیص کلامیدیاپنومونیه در پلاکهای آترواسکلروتیک عروق کرونر قلب

* **مواد و روشها**: نمونه‌های پلاک‌های آترواسکلروتیک عروق کرونر که طی جراحی از ۱۰۲ بیمار به دست آمده بود برای وجود DNA کلامید یا پنومونیه با روش PCR (Polymerase chain Reaction) مورد بررسی قرار گرفت. همزمان فاکتورهای خطر رایج برای آترواسکلروز نیز بررسی شد.

* **یافته‌ها**: DNA کلامیدیاپنومونیه در پلاکهای آترواسکلروتیک ۲۳ بیمار (۲۲ درصد) تشخیص داده شد. شایع‌ترین فاکتورهای خطر رایج برای آترواسکلروز به ترتیب شامل افزایش کلسترول، کاهش HDL کلسترول، افزایش فشار خون، مصرف سیگار، دیابت و سابقه خانوادگی بیماری قلبی بود. غیر از دو بیمار سایر بیماران دارای حداقل ۱ و حداکثر ۳ فاکتور خطر برای آترواسکلروز بودند. در افرادی که از نظر DNA کلامیدیا پنومونیه مثبت بودند افزایش کلسترول نسبت به افرادی که فاقد DNA بودند به مراتب بیشتر بود.

* **نتیجه‌گیری**: نتایج این مطالعه شیوع متوسطی از وجود کلامیدیاپنومونیه در پلاکهای آترواسکلروتیک عروق کرونر را نشان داد و بر این اساس این مطالعه از فرضیه ارتباط عفونت کلامیدیاپنومونیه با آتروژنز حمایت می‌نماید.

* **گل واژگان**: آترواسکلروز، کلامیدیاپنومونیه، PCR

مقدمه

آترواسکلروز بعنوان یک عامل مرگ و میر و ناتوانی در کشورهای مختلف شناخته شده است و اگرچه فاکتورهای خطر سیستمیک باعث مستعد و پیشرفت آن می‌شود اما بیماری ترجیحاً نواحی خاصی از عروق را تحت تأثیر قرار می‌دهد. فاکتورهای خطر متعددی در بوجود آمدن پلاکهای آتروا سکلروتیک دخالت دارند که از جمله می‌توان به افزایش کلسترول خون، مصرف سیگار، دیابت شیرین و افزایش فشار خون اشاره کرد (۱).

کلامید یاپنومونیه به عنوان یک عامل شایع عفونتهای تنفسی شناخته شده است و علت ۱۰ درصد از پنومونیهای کسب شده در جامعه است (۲). شیوع آنتی‌بادی اختصاصی ضد کلامیدیاپنومونیه در بالغین به بیش از ۶۰ درصد می‌رسد (۳) و طیفی از علائم بالینی از پنومونی شدید تا عفونت بدون علامت که شایع نیز می‌باشد را در بر می‌گیرد (۴).

مطالعات سرواپیدمیولوژیک در بیماران مبتلا به بیماری عروق کرونر ارتباطی بین وجود آنتی بادی ضد کلامیدیاپنومونیه و آترواسکلروز را نشان داده است (۵، ۶). علاوه بر این چندین مطالعه روشهای تشخیصی متعدد نظیر PCR، ایمونوسیتوشیمی، میکروسکوپ الکترونی و هیبریدیزاسیون را برای تشخیص ارگانیزم در ضایعات آترواسکلروتیک نواحی مختلف عروق به کارگرفته‌اند (۷، ۸، ۹). همچنین جداسازی ارگانیزم زنده از آترومای شریان کاروتید و کرونر قلب اخیراً گزارش شده است (۱۰، ۱۱).

در برخورد با بیماری عروق کرونر و انسداد آنها فقط به فاکتورهای خطر رایج توجه می‌شود و لیکن نباید از نقش احتمالی عفونت غافل ماند چرا که درمان ضد کلامیدیائی افراد مبتلا به عفونت که دچار آترواسکلروز شده‌اند باعث کاهش حوادث بعدی می‌شود (۱۲، ۱۳). به دلیل فقدان اطلاعات مشخص و کافی در مورد وجود کلامیدیاپنومونیه در پلاکهای آترواسکروتیک در ایران و با توجه به عوارض این عفونت، تحقیق حاضر در نظر دارد وجود ژنوم کلامیدیاپنومونیه را در پلاکهای آترواسکروتیک عروق کرونر بررسی کند.

مواد و روشها

* نمونه برداری

در این مطالعه ۱۰۲ نمونه پلاک آترواسکلروتیک شریان کرونر قلب از ۱۰۲ فرد مختلف (۷۵ مرد و ۲۷ زن) توسط جراحی عروق به دست آمد. مشخصات اصلی بالینی در جدول ۱ نشان داده شده است. نمونه‌های پلاکها در قطعات ۳ میلی‌متری قطعه قطعه و در ظروف استریل مخصوص تا زمان آزمایش در °۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

* استخراج DNA

به منظور استخراج DNA ابتدا بافت سه بار با آب مقطر استریل شسته شده و سپس به آن یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه نموده تا بافت خوب یکنواخت شود. سپس لوله حاوی بافت در دور ۴۰۰g به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد و بعد از خارج ساختن محلول روئی بافت دو بار با آب مقطر استریل شسته شد. بعد به بافت ۱ میلی‌لیتر بافر لیز کننده حاوی سوکروز ۰/۳۲ مولار، بافرتریس - هیدروکلراید ۱۰ میلی‌مولار، کلریدمنیزیوم ۵ میلی‌مولار وترایتون X-۱۰۰ یک درصد اضافه نموده وخوب مخلوط کرده و به مدت یک شب در درجه حرارت اتاق قرار دادیم. بعد از سپری شدن این زمان لوله حاوی بافت را سانتریفوژکرده و پس از خارج ساختن محلول روئی مجدداً به آن بافرلیز کننده اضافه نموده تا خوب مخلوط شود و لوله را با دور ۴۰۰g به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ کردیم. پس از خارج ساختن محلول روئی به رسوب آن ۵۰ میکرولیتر سود ۵۰ میلی‌مولار اضافه کرده وبه مدت ۲۰ دقیقه درآب جوش قرار دادیم وبعد به آن ۲۰ میکرولیتر بافرتریس ۱ مولار اضافه نموده و به مدت ۳ دقیقه در ۴۰۰g سانتریفوژ کردیم. محلول روئی حاوی DNA بود که به روش اتانول استات سدیم عمل غلیظ شدن DNA بر روی آن انجام شد.

* روش PCR

برای تشخیص DNA کلامیدیا از PCR یک مرحله‌ای با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط Holland برای تشخیص قطعه‌ای از ژن پروتئین غشاء خارجی I با توالی

CP_1: 5'CCTGTGGGGAATCCTGCTGAA 3'

CP_2: 5'GTCGAAAACAAAGTCAGTAGTA 3'

استفاده کردیم (۱۴). PCR برروی ۵ میکرولیتر از DNA تغلیظ شده در حجم نهائی ۳۰ میکرولیترانجام شد.

مخلوط واکنش نهائی حاوی ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، ۱۵۰ میکرومول از مخلوط dNTP، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲/۵ واحد Tag پلی مراز، ۵۰ میلی‌مول KCl و ۱۰ میلی‌مول بافرتریس-هیدروکلراید بود. آمپلیفیکاسیون در یک ترموسایکلر اتومانیک برای ۳۰ سیکل در مرحله دناتوراسیون °۹۴ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (۳ دقیقه برای اولین سیکل)، مرحله آنلینگ °۵۴ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله extention °۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (۱۰ دقیقه برای آخرین سیکل) انجام شد.

محصول PCR شامل ۱۴۴ جفت باز بود که بوسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید آشکار شد. در هر ارزیابی کنترل منفی و مثبت استفاده شد. کنترل منفی شامل تمام معرفهای PCR غیر از DNA بود که به جای آن آب مقطر استفاده شده و برای کنترل مثبت از DNA خالص شده کلامید یا سوش استاندارد و برای کنترل بافت از بافت میوم استفاده شد. برای اثبات وجود محصول PCR با ۱۴۴ جفت باز از DNA مارکر ۱۰۰ جفت باز استفاده شد.

یافته‌ها

تمامی ۱۰۲ نمونه پلاکهای آترواسکلروتیک عروق کرونر اخذ شده از نظر وجود DNA کلامیدیاپنومونیه مورد بررسی قرارگرفت. فاکتورهای خطر رایج برای آترواسکلروز در تمامی بیماران به استثناء ۵ بیمار بررسی شد. افزایش کلسترول ،کاهش HDL کلسترول، افزایش فشار خون، مصرف سیگار، دیابت شیرین، سابقه خانوادگی بیماری قلبی و سابقه آنفارکتوس میوکارد به ترتیب در ۵۰، ۳۴/۵، ۲۲/۷، ۴۵/۴،

۱۶/۳، ۲۵/۴ و ۱/۸ درصد از بیماران مشاهده شد.

به استثناء دو نمونه که فاقد فاکتورهای خطر رایج برای آترواسکلروز بودند بقیه موارد حداقل دارای یک فاکتور خطر و حداکثر دارای سه فاکتور خطر به طور همزمان بودند.

در افرادی که از نظر DNA کلامیدیاپنومونیه مثبت بودند افزایش کلسترول نسبت به افرادی که فاقد DNA کلامیدیاپنومونیه بودند از نظر آماری اختلاف معنی داری داشت. اما در مورد سایر فاکتورهای خطر، تفاوت معنی داری از نظر آماری ملاحظه نشد.

انسداد ۳ شریان کرونر با شیوع ۵۰/۹ درصد شایع‌ترین نوع انسداد بوده و اکثریت موارد انسداد (۹۸ درصد) مربوط به انسداد اولیه بود و بیشترین میزان انسداد در شریان اصلی کرونر (LAD) ملاحظه شد.

DNA کلامیدیاپنومونیه با روش PCR در ۲۳ نمونه (۲۲ درصد) تشخیص داده شد. شکل ۱ الکتروفورز ژل آگارز نمونه مثبت، منفی، کنترلهای منفی و مثبت وکنترل بافت را نشان می‌دهد.

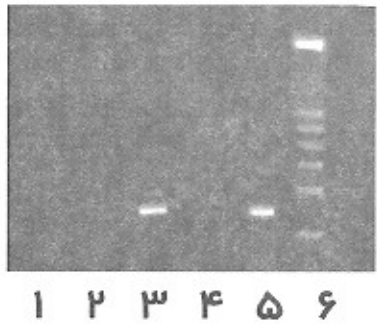
جدول ۱: مشخصات بالینی ۱۰۲ بیمار مورد استفاده در مطالعه حاضر

مرد	۷۵ (۷۵)
زن	۲۷ (۲۵)
افزایش کلسترول (بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۵۵ (۵۰)
افزایش فشار خون	۲۵ (۲۲/۷)
دیابت شیرین	۱۸ (۱۶/۳)
سابقه فامیلی قلبی	۲۸ (۲۵/۴)
مصرف سیگار	۵۰ (۴۵/۵)
سابقه آنژکتوس قلبی	۲ (۱/۸)
انسداد شریان کرونر	
یک شریان	۲۱ (۲۰/۳)
دو شریان	۹ (۸/۷)
سه شریان	۵۲ (۵۰/۹)
نوع انسداد کرونر	
اولیه	۹۸ (۹۸)
ثانویه	۲ (۲)
نوع شریان انسداد یافته کرونر	
LAD	۹۱ (۸۹)
LCX	۶۲ (۶۷)
RCA	۴۳ (۶۸)

LAD= Left anterior descending artery

LCX= Left circumflex artery

RCA= Right coronary artery



شکل ۱: شماره ۱: بافت کنترل، شماره ۲: نمونه منفی، شماره ۳: نمونه مثبت، شماره ۴: کنترل منفی، شماره ۵: کنترل مثبت، شماره ۶: DNA مارکر 100bp

بحث

بعد از اولین گزارش تشخیص کلامیدیاپنومونیه در پلاک‌های آترواسکروتیک عروق کرونر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی توسط Shor و همکاران در سال ۱۹۹۲ (۹) نزدیک به پنجاه، مقاله منتشر شده این یافته را مورد تائید قرار داده و یا آن را تکذیب نموده‌اند. در حالی که تعداد کمی از مطالعات عدم کلامیدیا در پلاک‌های آترواسکلروتیک را گزارش نموده‌اند. اکثر مطالعات انجام شده شیوع بالائی از وجود ارگانیزم را در پلاکها ثابت کرده‌اند.

میزان شیوع وجود ارگانیزم در مطالعات انجام شده در ایالات متحده از ۱۳ تا ۶۹ درصد (میانگین ۵۳ درصد) گزارش شده است (۱۵). در حالی که در مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان میزان شیوع از صفر تا صد در صد (میانگین ۴۳ درصد) گزارش شده است (۱۵).

با توجه به نتیجه به دست آمده از مطالعه حاضر شیوع کلامیدیاپنومونیه در پلاکهای آترواسکلروتیک عروق کرونر ۲۲ درصد است که این مقدار با مقادیر گزارش شده از دیگر مطالعات همخوانی دارد.

علاوه بر این در بررسی انجام شده در ایران با روش کشت از تعداد ۳۶ مورد پلاک مورد آزمایش شیوع ۱۷ درصدی گزارش شده است که نتیجه به دست آمده تحقیق حاضر را تائید می‌نماید. بالاتر بودن میزان شیوع گزارش شده توسط مطالعه حاضر نسبت به مطالعه مذکور ناشی از روش تشخیص است و به نظر می‌رسد که PCR برای تشخیص روش حساستری باشد و مشکل در جداسازی ارگانیسم زنده از بافتهای آترواسکلروتیک تنها مشکل کلامیدیاپنومونیه نیست و جداسازی ارگانیسمهای دیگر نیز از بیماریهای مزمن به سختی انجام می‌پذیرد و احتمالاً تعدیل در روشهای جداسازی ممکن است حساسیت روش کشت را بهبود ببخشد.

اختلاف در میزان شیوع وجود ارگانیزم مربوط به روشهای تشخیصی حداقل در ۴ مطالعه گزارش شده است که در این مطالعات بین روشهای تشخیصی ارتباط و همسوئی وجود نداشت و با روشهای ایمونوسیتو شیمی شیوع بالاتری نسبت به روش PCR گزارش شده است (۷، ۱۰، ۱۶، ۱۷). که این یافته مغایر با حساسیت دو روش است چراکه PCR روشی بسیار حساس‌تر است. دلیل این تناقض ممکن است مربوط به وجود مهارکنندهٔ PCR در نمونه‌ها و یا سختی در جداسازی DNA از بافت باشد.

باتوجه به اثرات مستقیم کلامیدیاپنومونیه در دیواره عروق و رشد آنها در سلولهای آندوتلیال عروق و همچنین اثرات مستقیم ارگانیزم بر آماده سازی ماکروفاژ برای جذب LDL اکسید شده که اولین مرحله در شروع پدیده آتروژنز است وجود آترواسکلروز در دو بیمار بدون هرگونه فاکتور خطر رایج به همراه وجود کلامیدیاپنومونیه را می‌توان به این اثرات نسبت داد. به این ترتیب ممکن است وجود کلامیدیاپنومونیه‌الزاماً به همراه عوامل اکسیدکننده واکسیداسیون بیش از افزایش کلسترول اهمیت داشته باشد.

با توجه به اختلاف معنی دار میزان کلسترول در افراد مثبت از نظر

DNA کلامیدیاپنومونیه نسبت به افرادی که فاقد DNA هستند فرضیه اثر غیر مستقیم عفونت بر فاکتورهای خطر و تعدیل این فاکتورها توسط ارگانیسم مزبور تقویت می‌شود.

در نهایت این مطالعه از وجود کلامیدیاپنومونیه در پلاکهای آترو اسکلروتیک عروق کرونر و فرضیه ارتباط عفونت و آترواسکلروز حمایت می‌نماید اما نباید از نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات مشابه برای پاسخ قطعی به نقش اتیولوژیک ارگانیزم استفاده شود زیرا تشخیص ارگانیزم در ضایعات به تنهائی برای اثبات نقش پاتولوژیک آن کافی نیست و برای تحقیقات بعدی در زمینهٔ نقش اتیولوژیک ارگانیسم، مطالعات باید بر روی مدلهای حیوانی، کارآزمایی درمانی و مطالعات in vitro با استفاده از سلولهای آندوتلیال عروق کرونر برای اثبات نقش مستقیم ارگانیسم در اتروژنز انجام شود.

References

1. Fauci R, Faunvald A, Isselbackes S: Atherosclerosis in Harrisons principle's of Internal medicine. Peter libby (ed). New York Grow-Hill companies, 1998 ,pp 345-352
2. Gaydos CA, Quinn TC, Bobo LD, Eiden JJ: Similarity of chlamydia pneumoniae strain in the variable domain IV region of the Major outer membrane protein gene. Infect Immunity 1992; 69: 5319
3. Blas F, Cosentini R, Clerici SM, LUPO A, Allegra L: Chlamydia pneumoniae seroprevalence in immunocompetent and immunocompromise papulation in Milan. Thorax 1992: 1261-1263
4. KUO CC, Jackson LA, Grayston JT: Chlamydia pneumoniae (TWAR). Clin Microbiol Rev 1995; 8: 451-461
5. Saikku P, Leinonen M, Mattila K: Serological evidence of an association of novel chlamydia, TWAR, with chronic Coronary heart disease and acute myocardial infatcrion. Lancet 1988; 2: 983-986
6. Saikku P, Leinonen M, Tenkanenk, etal: Chronic chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Ann Intern Med 1992; 116: 223-228
7. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT: Determination of chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. J Infect Dis 1993; 167: 841-849
8. Kuo CC, Gown A, M, Benditt EP, Grayston JT: Detection of chlamydia pnemoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. Arterioscler Thromb 1993; 13: 1501-1504
9. Shor A, Kuo CC, patton DL: Detection of chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. S Afr Med J 1992; 82: 58-61
10. Jackson La, campbell LA, Kuo CC , Rodrigues DI, Lee A, Grayston JT. Isolation of chlamydial pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. J Infect Dis 1997; 176: 222-225
11. Maass M, Barteles C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH: Endovascular presence of viable chlamydia pneumoniae is a common phenomenon in coronary artery disease. J Am coll Cardiol 1998; 31: 827-832
12. Sinisalo J,Mattila K ,Nieminen MS: The effect of prolonged Deoxycycline therapy on chlamydia pneumoniae serological markers, coronary heart disease risk factor and forearm basal nitric oxide production. J Antimicrobial chemother 1998; 41: 85-94
13. Gurfinkle E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B: Randomised trial of Roxithromycin in non Q-Wave coronary syndromes: Roxis pilot study. Lancet 1992; 320: 404-407
14. Holland SM, Gaydos CA, Quinn TC: Detiction and differentiation of chlamydia trachomatis, chlamydia psittaci, and chlamydia pnemuniae by DNA amplification. J Infeet Dis 1990; 162: 984-987
15. Kuo CC, campbell LA: Dettetion of chamydia pneumoniae in arterial tissue. J Infect Dis 2000; 181 (Suppl 3): S 432-436
16. Campbell LA, O'Brein ER, Cappoccio AL: Detection of chlamydia pneumoniae (TWAR) in human coronary atherectomy tissue. J Infect Dis 1995; 172: 585-588
17. Davidson M, Kuo CC, Grayston JT: Confirmed previous infection with chlamydiae (TWAR) and its persence in early coronary atherosclerosis. Circulation 1998; 98: 628-633