ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
---

(19)

المملكة المغربية
المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :
MA 34355 B1

(51) Cl. internationale :
G01N 33/53

(43) Date de publication :
03.07.2013

(21) N° Dépôt :
35518

(22) Date de Dépôt :
31.12.2012

(30) Données de Priorité :
05.08.2010 IT RM2010A000442

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/IT2011/000276 01.08.2011

(71) Demandeur(s) :
D.M.G. ITALIA SRL, Via Laurentina Km 26 700 I-00040 Pomezia Rome (IT)

(72) Inventeur(s) :
CUCCHIARA, Salvatore ; STRONATI, Laura ; VITALI, Roberta

(74) Mandataire :
SMAS INTELLECTUAL PROPERTY

(54) Titre : **UTILISATION DE HMGB1 EN TANT QUE MARQUEUR BIOLOGIQUE D'ÉTATS INFLAMMATOIRES INTESTINAUX, PROCÉDÉ NON INVASIF POUR SA DÉTECTION DANS DES ÉCHANTILLONS FÉCAUX ET SA TROUSSE**

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé non invasif pour la mesure d'un état inflammatoire intestinal chez des êtres humains par la présence de la protéine HMGB1 dans des extraits fécaux et l'implication d'une telle protéine dans la pathogénèse de maladies inflammatoires intestinales chroniques, plus particulièrement de la maladie de Crohn (CD) et de la colite ulcéreuse (UC), comprenant un protocole d'analyse pour détecter la présence de HMGB1 dans des selles par un essai de transfert Western ou un essai d'ELISA à l'aide d'un couple antigène-anticorps approprié. L'invention concerne également la trousse colorimétrique pour la mise en Suvre d'un tel procédé.

استخدام HMGB1 كمؤشر حيوي لحالات التهاب الأمعاء، وطريقة غير باضعة للكشف عنها في عينات براز وطقم خاص بذلك

الملخص

يتعلق الاختراع الراهن بطريقة غير باضعة لقياس حالة التهاب الأمعاء في البشر من خلال وجود بروتين HMGB1 في مستخلصات البراز ودور هذا البروتين في نشوء أمراض الأمعاء الالتهابية المزمنة, وأكثر تحديداً مرض كرون (CD) والتهاب القولون التقرحي (UC), تتضمن بروتوكول تحليلي للكشف عن وجود HMGB1 في البراز من خلال معايرة بقعة ويسترن أو معايرة ELISA باستخدام جسم مضاد–مولد مضاد مناسب. ويشتمل الاختراع أيضاً على طقم تحليل بقياس اللون لإجراء هذه الطريقة.

03 JUIL 2013

بسم الله الرحمن الرحيم

استخدام HMGB1 كمؤشر حيوي لحالات التهاب الأمعاء، وطريقة غير باضعة للكشف عنها في عينات براز وطقم خاص بذلك

مجال الاختراع

يتعلق الاختراع الراهن بمواد وطرق للكشف عن أمراض الأمعاء الالتهابية المزمنة (IBD "مرض الأمعاء الالتهابي") في البشر وتشخيصها. وتحديداً, يصف الاختراع الراهن طريقة غير باضعة لقياس حالة التهاب الأمعاء في البشر من خلال وجود بروتين HMGB1 في مستخلصات البراز ودور هذا البروتين في نشوء أمراض الأمعاء الالتهابية المزمنة, وأكثر تحديداً مرض كرون (CD) والتهاب القولون التقرحي (UC). ويشتمل الاختراع أيضاً على طقم تحليل بقياس اللون لإجراء هذه الطريقة.

خلفية الاختراع

يمثل بروتين المجموعة عالية الحركة 1 (HMGB1) بروتين نووي لاهيستوني مرتبط بكروماتين لاهيستوني, ينشأ في صورة نمط أولي لجزيئات DAMP (أنماط جزيئية مرتبطة بالضرر) قادر على الاستجابة للمنبهات الناتجة من تلف الأنسجة عن طريق حث الاستجابة الالتهابية (1). ويفرز HMGB1 على نحو فعال من البلاعم (2) والخلايا المعوية (3) بعد المنبهات الالتهابية الأولية مثل LPS, TNFα, IL-1β, IL-6, و IL-8 (4) ويطلق بواسطة الخلايا النخرية, وليس الخلايا الاستماتية (5). ويشكل HMGB1, عند إفرازه إلى حيز خارج الخلايا, متراكبات التهابية مرتفعة مع جزيئات مختلفة: DNA وحيد الجديلة, LPS, IL-1β وجسيمات نووية, والتي تتفاعل مع مستقبلاتها الخاصة, مثل TLR9, TLR4, IL-1R و TLR2, تعمل على تنشيط المناعة الفطرية. وبدلاً من ذلك, يمكن أن يربط HMGB1 دون تشكيل متراكبات, مستقبل المنتجات النهائية لعملية الغليكلة RAGE (مستقبل منتجات نهائية لعملية غليكلة متقدمة) (6).

ويحث HMGB1 خارج الخلية إنتاج وسائط التهابية (4) وقد يلعب دوراً مهماً في نشوء أمراض المناعة الذاتية أو الالتهابية, بما في ذلك التهاب المفاصل الروماتويدي (7), الذئبة الحمراء الجهازية (8) والتهاب العضلات (9). ويتعلق الاختراع الموصوف في براءة الاختراع الأمريكية رقم 6303321 بتركيب صيدلي لمعالجة تعفن الدم. ويشتمل التركيب الصيدلي كمادة نشطة على مقدار فعال من مادة مناهضة أو مثبطة لـ HMGB1. ويفضل, من بين المواد

المناهضة لـِ HMGB1, استخدام أجسام مضادة ترتبط مع بروتين HMGB1, تسلسلات مضادة للإحساس للجين الذي يحمل شيفرة HMGB1 ومواد مناهضة لمستقبل HMGB1. وبالتالي, يتمثل موضوع الاختراع أيضاً بطريقة لمعالجة تعفن الدم تتضمن إعطاء مقدار فعال من المادة المناهضة لـِ HMGB1. ويزود الاختراع أيضاً طريقة تشخيصية وتنبؤية لمراقبة خطورة حالة المريض وتوقع المسار السريري المحتمل لتعفن الدم والحالات ذات الصلة للمريض الذي يعاني من أعراض تشبه الصدمة أو أعراض مرتبطة بذلك. وتتضمن الطريقة التشخيصية والتنبؤية قياس تركيز بروتين HMGB1 في العينة, تحديداً في مصل الدم أو الدم كاملاً, ومقارنته مع تركيز قياسي لـِ HMGB1. وتدل المستويات المرتفعة من HMGB1 على سوء التشخيص أو حدوث محتمل للتفاعلات السامة. ويمكن أيضاً تطبيق الطريقة التشخيصية على أنسجة أو أحياز لسوائل أخرى مثل المائع النخاعي أو البول.

HMGB1 والقناة الهضمية: التقنية السابقة

تؤدي علامات الإجهاد, تلف الأنسجة أو مولدات المضادات الجرثومية في خلايا تنشيط الغشاء المخاطي المعوي التي تشارك في الاستجابة المناعية الفطرية, مثل الخلايا البلعمية والتغصنية, إلى إطلاق الاستجابة الالتهابية.

ويؤثر وجود HMGB1, المطلق في النسيج خارج الخلية بعد المنبهات الالتهابية, بشكل كبير على وظيفة الحاجز المعوي عن طريق تعديل نفاذية الخلايا الظهارية المعوية مما يؤدي إلى إيلاج متزايد لمولدات المضادات الجرثومية. وفي الواقع, في الدراسات المخبرية وعلى الكائنات الحية, تم الربط بين وجود HMGB1 الذي تم إفرازه بواسطة الخلايا المعوية المنبهة مناعياً, أو بواسطة خلايا مناعية أخرى, والاختلالات الوظيفية للحاجز المعوي (10-15). وعلاوة على ذلك, بسبب إطلاق السيتوكينات الالتهابية, يكون لـِ HMGB1 أيضاً على نحو محتمل دور في التهاب القولون, كما ظهر في النماذج الحيوانية (16, 17), وفي الأشكال الناخرة للالتهاب القولون (18, 19).

ويرتبط الانخفاض في HMGB1 الذي تم إفرازه, بسبب جزيئات مضادة لـِ HMGB1 مع التطور في كل من تلف الحاجز المعوي وفي التهاب الأغشية المخاطية (11, 13, 14, 16, 19, 20).

وقد استخدم بالفعل وجود بروتين HMGB1 والمقادير منه في عينات الأنسجة التي تم الحصول عليها من المرضى كمؤشر تشخيصي وتنبؤي لسرطان الأمعاء, تحديداً لسرطانات القولون والمستقيم كما وصف في طلب براءة الاختراع الأمريكي رقم 2006/0188883. ومن ناحية أخرى, من المعروف جيداً أن مرض السرطان هو حالة مختلفة جداً عن أمراض الأمعاء

الالتهابية. وعلاوة على ذلك, يكون موضوع طلب براءة الاختراع قابل للتطبيق فقط في استخدام الأنسجة الحيوية ولم يتم الإشارة إلى ما يتعلق باستخدام مادة البراز.

وفي المقالة الحديثة باسم ديف ومعاونيه, (16) تم توضيح نتائج تتعلق باستخدام عامل مضاد للالتهاب مثل بيروفات الإثيل في النموذج الفأري مصاب بالتهاب القولون المزمن لتقليل إفراز HMGB1. وأظهرت الاختبارات التي تم إجراؤها على عينات براز أن مستويات HMGB1 في البراز تقل بعد إعطاء بيروفات الإثيل.

ومن ناحية أخرى, تتعلق التجارب التي تم إجراؤها من قبل ديف على التهاب القولون فقط بالنموذج الفأري, ومن المعروف أن النتائج التي تم الحصول عليها لا تنطبق دائماً على البشر وأمراضهم؛ وفعلياً في كثير من الأحيان لا تتوافق النتائج التي تم الحصول عليها باستخدام نماذج حيوانية مطلقاً مع أمراض البشر المناظرة, فيما يتعلق بكل من المؤشرات الجزيئية, وفي المسار السريري للمرض وفي الاستجابة للمعالجات المحددة.

وعلاوة على ذلك, يستخدم أيضاً في النموذج الفأري المستخدم في هذه الدراسة سلالة معدلة جينياً للفئران مع حذف الجين الذي يحمل شيفرة IL-10, سيتوكين مضاد للالتهاب, مما يسبب التهاب القولون في الفئران. وهذه حالة إلى حد ما غير مماثلة لحالة مرض البشر حيث تحدد عوامل مساعدة معقدة بداية المرض.

الكشف عن الاختراع

في الواقع، من المعروف جيداً أن التغير الجيني والبيئي الذي يُميّز البشر، غير قابل مطلقاً للإنتاج في النماذج الحيوانية المخبرية. وبالتحديد، تكون أمراض الأمعاء الالتهابية عبارة عن أمراض متعددة العوامل حيث يلعب التغير الجيني والبيئي دوراً مهماً في بدء وتطور المرض.

وفي الواقع، حتى الآن، تم تحديد أكثر من ثلاثين موضع سريع التأثر بـ CD وأقل من ذلك بالنسبة لـ CU، وعلاوة على ذلك ليس كل الأفراد المتأثرين يعبرون عن نفس المتغيرات الجينية، بالإضافة إلى أن امتلاكهم للمتغير الجيني لا يعني بالضرورة الإصابة بالمرض: أي أن هناك تغير جيني كبير بين الناس المصابين بالمرض الالتهابي، على عكس النموذج الفأري الذي يسود فيه التجانس الجيني غالباً.

وبالإضافة إلى ذلك، يختلف الضغط البيئي، من حيث أسلوب الحياة (النظام الغذائي، التدخين، الإجهاد)، وكذلك استخدام العقاقير أو التعرض للعوامل البيئية المؤذية من شخص لآخر ويلعب دوراً في ظهور المرض، كما يختلف تركيب النبيت الجرثومي المعوي من فرد لآخر.

وبهذا الخصوص، من المهم تذكر أن الدراسات الحديثة جداً التي أجريت بواسطة مجموعات وطنية ودولية تؤكد على الدور الرئيسي للنبيت الجرثومي المطاعم في مرض الأمعاء الالتهابي، المعدل في الواقع في الأفراد المصابين مقارنة بالأفراد الأصحاء. ومرة أخرى، في الظروف القياسية، لا يعاني النموذج الفأري مطلقاً، أو بدرجة قليلة جداً على الأقل، من الضغوط البيئية، وكذلك تكون جانبية الأحياء المجهرية متغيرة بدرجة قليلة جداً في الأفراد الذي يتلقون نفس النظام الغذائي.

دور HMGB1 في الالتهاب المعوي عند البشر

هنالك عدد قليل جداً من الدراسات التي تتعلق بدور HMGB1 في التهاب الأمعاء عند البشر: وتشير نشرة صدرت مؤخراً إلى ربيطات RAGE، بما في ذلك HMGB1 منها، بصفتها "مؤشرات حيوية" محتملة للحالات المرضية مثل التهاب المفاصل والتهاب القولون (21)، وتُعرّف نشرة ثانية HMGB1 على أنه مولد مضاد جديد لـ ANCA (الأجسام المضادة السيتوبلازمية للعَدِلات)، كما يلاحظ في مصل المرضى الذين يعانون من التهاب القولون التقرحي (22).

بروتينات مستخدمة كمؤشرات للالتهاب المعوي

تمثل المؤشرات الحيوية طريقة غير باضعة لقياس الالتهاب بموضوعية كما أنها تلعب دوراً أساسياً أو ثانوياً في تقييم بعض الأمراض (23)، بما في ذلك مرض الأمعاء الالتهابي (IBD).

ويمكن تحديد هذه المؤشرات بصفتها مصلية أو برازية ويمكن استخدامها لتشخيص عملية معينة، ولتصنيف المرض إلى أنواع فرعية مختلفة، ولتقييم نشاطها وتطورها وعملية تنبؤها، ولتوقع الاستجابة للمعالجة الدوائية أو الانتكاس (24).

وتتمثل المؤشرات المصلية المتوفرة لعدة أمراض التهابية، بما في ذلك أمراض الأمعاء الالتهابية (IBDs) في: سرعة ترسب الكريات الحمراء (ESR)، بروتين سي التفاعلي (CRP)، الأجسام المضادة السيتوبلازمية للعَدِلات (ANCA)، الأجسام المضادة للسكيراء الجِعوِيّة (ASCA) (24). إلا أنها تظهر حساسية ونوعية منخفضة للالتهاب المعوي وترتبط بدرجة ضعيفة مع أعراض وأدلة نشاط المرض (24).

وبالمقابل، تظهر مؤشرات البراز خصوصية أكبر لتشخيص الأمراض المعدية المعوية، مثل IBD، لأن مستوياتها لا تزيد في الأمراض التي لا تشمل الجهاز الهضمي (25، 26)؛ وعلاوة على ذلك، لها ميزة تتمثل في أنها لا تتطلب بالضرورة تحليل بالمنظار لتقييم نشاط

المرض (26، 27). ويعتبر كل من لاكتوفيرين وكالبروتكتين الأكثر استخداماً كمؤشرات براز لالتهاب الأمعاء (24، 25، 28، 29). وفي الواقع، إن وجود هذه البروتينات في البراز يعتبر مقياساً دقيقاً بشكل معقول لنشاط المرض، التنبؤ بالانتكاس، وتحديد المجموعات عالية الخطورة في المرضى الذي يعانون من التهاب قولون شديد ومراقبة تأثيرات العلاجات الطبية.

ونظراً للحاجة المتزايدة لتحديد طرق الكشف عن الالتهاب المعدي المعوي التي تكون غير باضعة وذات حساسية وتخصصية عالية، واقتصادية أيضاً، يلزم الكثير من الاهتمام لتحديد جزيئات جديدة تحقق هذه الخصائص.

النتائج الموضوعية والأولية

نظراً لقدرة HMGB1 المعروفة جيداً في إطلاق إشارات موجهة لاستغلال مجموعة الخلايا الالتهابية وفي تنشيط الاستجابة المناعية نتيجة لمؤثرات خارجية أو داخلية، اقترح المخترعون دراسة دور هذا البروتين المحتمل في التسبب بأمراض الأمعاء الالتهابية عند البشر، وبالتحديد CD وUC.

ويتميز CD بالتهاب كامل الجدار الذي يمكن أن يصيب أي جزء من القناة الهضمية من الفم إلى فتحة الشرج. وعادة ما تتأثر الأجزاء بكيفية متقطعة. ويضم الالتهاب كامل جدار الجزء المصاب وينتشر في كثير من الأحيان إلى المساريق القريبة والعقد الليمفاوية. وفي معظم الأحيان يضم المعي اللفائفي والقولون.

وفي UC يقتصر الالتهاب على القولون ويؤثر فقط على الغشاء المخاطي. وتأثر المستقيم مستمر ويمكن أن يرافقه تأثر الجزء العلوي المتغير من القولون.

وفي الواقع يبلغ معدل انتشار هذه الأمراض في الدول الغربية (أوروبا وأمريكا الشمالية) حوالي 70–150 حالة لكل 100000 مقيم بالنسبة لـِ UC و20–40 حالة لكل 100000 مقيم بالنسبة لـِ CD. وتعتبر هذه الأمراض بشكل أساسي أمراض سن المراهقة والبلوغ، حيث تتراوح الأعمار الذروية بين 15 و35 سنة.

وفي هذا السياق، اهتم المخترعون كثيراً باكتشاف HMGB1 في براز المرضى الأطفال المصابين بـِ IBD، لأنه من المعروف أن هذا البروتين يمارس نشاطه الالتهابي عندما يفرز في النسيج الغشائي خارج الخلية، والبراز هو بالتحديد ما يتم إنتاجه وإزالته من المعي. وقد تم مقارنة البيانات التي تم الحصول عليها مع بيانات المجموعة الضابطة.

وقد كان من المدهش اكتشاف أن مستويات HMGB1 الملاحظة في براز المرضى المصابين بـ IBD قد ازدادت بشكل كبير مقارنة بتلك التي للضوابط السليمة (الشكل 1). وقد

سمح هذا بترسيخ استخدام تحديد HMGB1 في براز المريض باعتباره مؤشراً على الالتهاب المعوي. وبالإضافة إلى ذلك، فقد أصبح من الواضح أن المرضى ذوي الحدة المتوسطة من المرض (المجموعة التي يكون دليل مرض PUCAI/PCDAI ≥ 60/25)، بسبب الخضوع للعلاج، يظهرون وجوداً أقل لـ HMGB1 مقارنة بأولئك المصابين بالدرجة الحادة من المرض. ولذلك، يبدو هذا البروتين وإلى جانب كونه موشراً جيداً على الالتهاب، فإنه يبدو أيضاً دليلاً جيداً على الاستجابة للعلاج (الشكل 1). وقد تم توضيح المنهجية المطوّرة لهذا الغرض أدناه.

الوصف التفصيلي

أخذ العينات

تم تحليل عينات براز جُمعت من 40 طفل مريض مصابين بـ IBD، بالترتيب، 19 مريض مصاب بمرض كرون (CD) و21 مصاب بالتهاب القولون التقرحي (UC)، بالإضافة إلى 13 عينة ضابطة، لتقييم وجود HMGB1 بواسطة بقعة ويسترن. وقد طُوِّرت شروط بقع ويسترن خصيصاً لهذا الغرض حيث استُخدم اثنان من الأجسام المضادة المحددة للكشف عن HMGB1.

وأخضعت الأشرطة الظاهرة المرتبطة بوجود بروتين HMGB1 للتحليل بقياس الكثافة الذي تم إجراؤه باستخدام برنامج ImageQuant (جنرال إلكتريك للعلوم الحياتية للرعاية الصحية، أُبسالا، السويد)؛ وبذلك فقد كان من الممكن تعيين قيمة عددية لمدى من مستويات HMGB1.

وقد أُجري تشخيص IBD في المرضى وفقاً لمعايير التنظير الداخلي والمعايير النسيجية المعروفة والمشتركة على نطاق واسع (30). وقيس نشاط CD بواسطة "دليل نشاط مرض كرون عند الأطفال" (PCDA)، وهو مقياس يعتمد على وسائط سريرية ومخبرية (31): حيث اعتُبر المرض خاملاً إذا كانت القيمة ≥ 10، خفيفاً إلى متوسط إذا كانت القيمة > 10–30 وحاداً إذا كانت القيمة > 30. وقد تم ترتيب نشاط UC وفقاً لـ "دليل نشاط التهاب القولون التقرحي عند الأطفال" (PUCAI) (32): ويُعدّ الأخير طريقة متعددة الوسائط غير باضعة، تمت المصادقة عليها حديثاً، حيث يُعتبر المرض وفقاً لها في حالة خمود (نتيجة أقل من 10)، مرض خفيف (نتيجة تتراوح بين 10 و34)، متوسط (نتيجة تتراوح بين 35 و64) ومرض حاد (نتيجة تتراوح بين 65 و85).

ويتم تحديد نتيجة التنظير الداخلي باستخدام SES-CD (33) ونتيجة مات (34) بالنسبة لالتهاب القولون التقرحي. ولحساب SES-CD، قُسِّمت الأمعاء إلى خمسة أجزاء (المعي اللفائفي، القولون الأيسر، القولون المستعرض، القولون الأيمن، المعي المستقيم)، وخُصصت قيمة تتراوح

بين 0 إلى 12 لدرجة نشاط المرض في كل جزء (مدى القيمة الكلية: 0–60). ولحساب نتيجة مات قُسِّمت الأمعاء الدقيقة إلى ست أجزاء (الأعور، القولون الصاعد، القولون المستعرض، القولون النازل، القولون السيني، المعي المستقيم)، وخُصصت قيمة تتراوح بين 1 إلى 4 (مدى القيمة الكلية: 6–24) لدرجة نشاط المرض في كل مرض.

وبالاعتماد على هذه الدلائل في المرضى المدرجين في الدراسة فقد وجد أن المرض كان حاداً في 13 IBD (8 CD و5 UC)، خفيف إلى متوسط في 11 مريض (3 CD و8 UC)، وخاملاً في 16 (8 CD و8 UC) (الجدول 1).

ويذكر الجدول 1 المرضى، مقسمين وفقاً لنوع وحدّة المرض، المدرجين في التجربة السريرية.

الجدول 1. الخصائص الديموغرافية وأدلة نشاط المرض لـ IBD في مجتمع المرضى الذي تم دراسته. حيث PCDAI: "دليل فعالية مرض كرون عند الأطفال"، PUCAI: "دليل نشاط التهاب القولون التقرحي عند الأطفال"

الشخص	الجنس	العمر (سنة)	PCDAI
مرض حاد			
MCI	أنثى	10	57
MC2	ذكر	17	55
MC3	ذكر	10	35
MC4	ذكر	12	35
MC5	أنثى	12	35
MC6	ذكر	15	30
MC7	أنثى	17	35
MC8	أنثى	17	25
مرض متوسط			
MC9	ذكر	15	22
MC10	ذكر	9	17
MC11	ذكر	13	15
مرض خامل			

10	13	أنثى	MC12
10	16	أنثى	MC13
10	10	ذكر	MC14
10	14	ذكر	MC15
10	11	ذكر	MC16
5	18	ذكر	MC17
5	16	ذكر	MC18
5	12	ذكر	MC19
PUCAI	**العمر (سنة)**	**الجنس**	**الشخص**
			مرض حاد
80	14	أنثى	CU1
75	10	أنثى	CU2
75	12	ذكر	CU3
65	7	أنثى	CU4
65	11	ذكر	CU5
			مرض متوسط
60	14	أنثى	CU6
60	11	ذكر	CU7
50	15	ذكر	CU8
40	11	ذكر	CU9
40	14	أنثى	CU10
25	17	أنثى	CUll
15	13	ذكر	CU12
15	11	ذكر	CU13
			مرض خامل
10	18	أنثى	CU14

CU15	أنثى	18	5
CU16	أنثى	11	5
CU17	ذكر	12	0
CU18	ذكر	10	0
CU19	أنثى	10	0
CU20	أنثى	7	0
CU21	ذكر	14	0

تحضير عينة البراز

تم الحصول على عينات براز من أطفال مرضى مصابين بـ IBD (الجدول 1)، بدرجات مختلفة من حدة المرض، ومن ضوابط سليمة، مزودة من قبل قسم طب الأطفال، وحدة أمراض الجهاز الهضمي والكبد عند الأطفال، جامعة روما "لا سابينزا"، الذي يشرف عليه الأستاذ سالفاتور كوشيارا.

وتم تخزين العينات، التي جُمعت في أوعية معقمة للبراز، عند درجة حرارة تتراوح بين -20°م و-80°م حتى التحليل الجزيئي.

قياس وزن عينة البراز وتعليقها في محلول منظم لدرجة الحموضة

أُزيلت كل عينة (بمقدار مناظر لمحتويات ملعقة داخل وعاء معياري للبراز) باستخدام طرف معقم من الوعاء، ووضعت في أنبوب إيندورف بسعة 1.5 مل وقيس وزنها باستخدام ميزان رقمي. وأعيد تعليق العينة في محلول استخلاص منظم لدرجة الحموضة (المحلول الملحي المنظم بالفوسفات PBS بدرجة حموضة تبلغ 7.2) تم تسويقه من قبل شركة شيبو بيوتك يحوي مادة منظفة وأزيد الصوديوم، للحصول على تركيز نهائي يبلغ 500 ملغم/مل.

طحن (تكسير) واستخلاص البراز

تم تدويم العينة لمدة دقيقة واحدة عند درجة حرارة الغرفة (RT) ومن ثم وُضعت في هزّاز دوّار عند درجة حرارة الغرفة لحوالي ساعة واحدة. وبعد عملية طرد مركزي لمدة 5 دقائق بمعدل 10000 دورة في الدقيقة عند درجة حرارة 4°م، جُمعت المادة الطافية، التي تحدد البراز المستخلص، وقيس تركيز البروتين بواسطة معايرة برادفورد (بيولابس). ويمكن تحليل العينة التي تم الحصول عليها مباشرة بواسطة فحص بقعة ويسترن أو تخزينها عند درجة حرارة -80°م وتحليلها فيما بعد.

تحليل مستخلصات البراز بواسطة بقعة ويسترن

أُضيف إلى 20 ميكروغرام من البروتين المستخلص من البراز حجم مساوٍ من محلول منظم بالعينة بتركيز X2 (100مليمول من Cl–Tris (Tris: ثلاثي [هيدروكسي مثيل] أمينو ميثان)، بدرجة حموضة:6.8، 10٪ من بيتا–مركابتوإيثانول، SDS بتركيز 4٪ ، جليسرول بتركيز 20٪، برومو فينول أزرق بتركيز 0.2٪)، ثم تم غلي العينة لمدة 5 دقائق وفُصلت بالطرد المركزي لفترة وجيزة قبل متابعة تحليل المستخلصات بواسطة بقعة ويسترن (WB). وفُصل البروتين المستخلص من البراز باستخدام SDS–هلام متعدد أكريلاميد بتركيز 12٪ ومن ثم نُقل إلى مرشح PVDF (أمرشام)، بواسطة النقل بالكهرباء، لمدة ساعة عند 70 فلط. وتُحصر المواقع غير المحددة على المرشح بواسطة حضانته لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة باستخدام محلول منظم محصر (Cl–Tris بتركيز 0.02 مول ودرجة حموضة 7.6، NaCl بتركيز 0.137 مول، مسحوق خليب خالي الدسم بتركيز 5٪)، ثم تمت حضانة المرشح لمدة 16 ساعة عند درجة حرارة 4°م مع الجسم المضاد وحيد النسيلة لـ HMGB1 (Cat No. H9593، سيجما)، وخُفِّف بنسبة 1 :1000 في محلول منظم يحوي أجساماً مضادة (Cl–Tris بتركيز 0.02 مول ودرجة حموضة 7.6، NaCl بتركيز 0.137 مول، مسحوق خليب خالي الدسم بتركيز 3٪) أو مع جسم مضاد وحيد النسيلة لـ HMGB1 (Cat. No. MAB 1690، آر اند دي سيستمز، مينيابوليس، الولايات المتحدة الأمريكية) مخفف بنسبة 1 :500 في محلول منظم يحوي أجساماً مضادة. وبعدها تم إجراء غسل لثلاث مرات لمدة 5 دقائق لكل مرة في محلول ملحي منظم بـ Tris مع توين (TBS-T) ويبلغ تركيز التوين 0.1٪ (Cl–Tris بتركيز 0.02 مول ودرجة حموضة 7.6، NaCl بتركيز 0.137 مول، توين بتركيز 0.1٪)، وبعد ذلك، تمت حضانة المرشح لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة مع جسم مضاد ثانوي للجسم المضاد الأولي المأخوذ من الأرنب. وعند استخدام الجسم المضاد لـ HMGB1 المصنَّع من قبل سيغما، يُستخدم جسم مضاد ثانوي لجسم مضاد أولي مأخوذ من فأر في حال الحضانة مع جسم مضاد لـ HMGB1 مصنَّع من قبل أر اند دي سيستم، ويكون كلاهما مقترناً ببيروكسيداز (مصنَّع بواسطة سانتاكروز)، يُخفف بنسبة 1 :4000 في محلول منظم يحوي أجساماً مضادة. وتُجرى ثلاث عمليات غسل إضافية مدة كل منها 5 دقائق في TBS-T + توين بتركيز 0.1٪ ثم القيام بالكشف عن الإشارة المضيئة كيميائياً باستخدام ECLplus (أمرشام) وأفلام لتصوير الإشعاع الذاتي (كوداك).

ويبين الشكل 1 بروتين HMGB1 في عينات البراز، التي تم الكشف عنها بواسطة تحليل بقعة ويسترن باستخدام الجسم المضاد وحيد النسيلة لـ HMGB1 المصنَّع بواسطة آر اند دي سيستمز. وتحديداً، تظهر الصورة أ نتيجة بقعة ويسترن، وتظهر الصورة ب رسماً بيانياً لقيم قياس كثافة الأشرطة الظاهرة بواسطة بقعة ويسترن لدى المرضى، وتظهر الصورة جـ رسماً بيانياً لقيم قياس كثافة الأشرطة المبرزة بواسطة بقعة ويسترن لدى المرضى مقسَّمة إلى مجموعات وفقاً لحدة المرض.

ويسمح تحليل قياس كثافة الأشرطة الظاهرة بواسطة بقعة ويسترن بالحصول على قيمة عددية تتعلق بمستوى الـ HMGB1 الموجود في عينة البراز. وبالتحديد, وجد أنه في الأفراد الأصحاء تتراوح القيمة العددية هذه من 1000 إلى 3000, يعبر عنها بوحدات قياس كثافة اعتباطية (ADU), وتمثل القيمة المتوسطة 1200 ADU؛ ويظهر الأشخاص الذين يعنون من CD قيمة عديدة تتراوح من 20000 إلى 380000 ADU, تمثل القيمة المتوسطة 190000 ADU؛ بينما يظهر كل المرضى المصابين بـ UC قيمة عددية تتعلق بمستوى الـ HMGB1 الموجود في عينات البراز التي تم تحليلها تتراوح من 6000 إلى 280000 ADU, بقيمة متوسطة مساوية لـ 120000 ADU (الشكل 1–ب). وفي الشكل تشير العلامات النجمية إلى أهمية إحصائية تم تقييمها خلال اختبار احصائي وفقاً لمان ويتني: حيث *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001.

ويبين التحليل أن التعبير عن بروتين HMGB1 يزداد بصفة جوهرية في براز مرضى IBD مقارنة بالضوابط, حيث لا يمكن الكشف عنها (P< 0.001) (الشكل 1). وتشير هذه النتيجة إلى أن وجود بروتين HMGB1 الذي تم الكشف عنه في البراز يمثل مؤشر على وجود التهاب في الأمعاء البشرية. وتم الكشف عن وجود بروتين HMGB1 أيضاً في براز 16 مريض مع مرض محدد خامل على أساس مؤشرات الـ PCDAI و PUCAI؛ ومع ذلك, وفقاً لتقييم نتيجة التنظير الداخلي, كان لدى هؤلاء المرضى بعض التمدد في التهاب الأمعاء, بما يتفق مع الكشف عن وجود الـ HMGB1 في برازهم.

بالتحديد, في المرضى المصابين بـ CD و UC فعال, بلغت القيمة المتوسطة للـ SED-CD ولنتائج وفقاً لمات بالترتيب 23.0 (قيم مدى: 14–34) و 18.0 (قيم مدى: 8–24), وفي المرضى المصابين بـ CD و UC خامل بلغت القيمة المتوسطة للـ SED-CD ولنتائج وفقاً لمات بالترتيب 7.5 (قيم مدى: صفر–15) و 11.5 (قيم مدى: 6–18). وتبين هذه الدلائل أنه حتى في المرضى المصابين بمرض محدد خامل وفقاً لدلائل PCDAI و PUCAI أنه يوجد

إشارة لوجود التهاب الأمعاء, وأنه يمكن لـــ HMGB1 أيضاً تزويد إشارة إلى الحالة الخاملة للمرض وبذلك يعتبر كمؤشر حساس جداً لظروف التهاب خامل من هذا القبيل. وتم مقارنة مستويات بروتين HMGB1 التي تم الكشف عنها في البراز مع تلك لمستوى بروتين الكالبروتيكتين في البراز, الذي يعتبر حالياً مؤشر حيوي مفضل وموثوق به لتشخيص التهاب الأمعاء عن طريق اختبار ELISA (29, 35). وتبين نتائج هذا التحليل في الشكل 2, حيث تشير العلامات النجمية إلى أهمية إحصائية تم تقييمها خلال اختبار احصائي وفقاً لمان ويتني: حيث *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001. وأدى إلى إرتفاع كبير في كلا البروتينين في براز المرضى (P< 0.001) مقارنة مع الضوابط السليمة (الشكل 1–ب, الشكل 2–أ). ومع ذلك, تبين مجموعات CD و UC خاملة مستوى منخفض لبروتين الكالبروتيكتين, لكن زيادة كبيرة في مستويات الـــ HMGB1 في البراز مقارنة بالضوابط (P< 0.01 في CD و UC) (الشكل 1–جـــ, الشكل 2–ب). وخلاصة القول, تبين المقارنة وجود ارتباط كبير بين مستويات البروتينين في عينات البراز في جميع المرضى مع تشخيص مرض التهابي فعال, كل من CD و UC (r: 0.77 في CD, r: 0.70 في UC, P< 0.01) مع r= ترتيب معامل الارتباط وفقاً لاختبار سبيرمان. ويختفي هذا الارتباط عند الاخذ بالاعتبار فقط مرضى يعانون من مرض التهابي خامل (r: 0.22 في CD, r: 0.18 في UC, لا يوجد أعراض). وفي الواقع, يكون بروتين HMGB1 مرتفع بدرجة كبيرة في كل المرضى الـــ 16 مع أيضاً مرض خامل محدد وفقاً لمؤشرات PCDAI و PUCAI, بالرغم من أنها لا تزال تظهر درجة من الالتهاب وفقاً لنتيجة التنظير الداخلي, في حين كان بروتين الكالبروتيكتين مرتفع عند فقط اثنين منهم. وقد يشير ذلك إلى أن بروتين HMGB1 عبارة عن مؤشر حساس جداً لالتهاب الأمعاء المتكرر في المرضى مع مرض هامد سريرياً, كما يتضح من المؤشرات التقليدية لفعالية المرض. ولا تكون هذه الاخيرة, مع ذلك, بكونها خليط من سمات سريرية ومختبرية, في العادة مرتبطة مع التهاب الأمعاء الذي تم الكشف عنه عن طريق التنظير الداخلي.

وبذلك يكون من الممكن استخدام الـــ HMGB1 بصفته وسيط تنبؤي جزيئي محتمل لعودة المرض في مرضى يعانون من مرض في حالة خمود ظاهري. وفي الشكل 1, يظهر مرضى يعانون من IBD زيادة كبيرة لـــ HMGB1 في البراز مقارنة بالضوابط الصحية. وبالإضافة إلى ذلك, يوجد هناك ارتباط مباشر بين مستويات الـــ HMGB1 وشدة المرض. وأخيراً, يبدو الـــ HMGB1, بجانب كونه مؤشر جيد للالتهاب, أنه يوفر أيضاً كاشف جيد لشدة المرض و, بذلك, يمكن استخدامه كمؤشر على الاستجابة للعلاج.

ويتضح مما تم وصفه هنا على أهمية الاختراع الراهن: أن استخدام الـ HMGB1 بصفته مؤشر حيوي والطريقة المستخدمة للكشف عن وجوده في عينات البراز تمثل خطوة مهمة نحو الأمام من أجل تشخيص بطريقة آمنه وغير باضعة عن وجود ومستوى التهاب الأمعاء البشري, وتجنب الدراسات التصويرية المتكررة في الغالب التي تكون مؤلمة بالنسبة لمعظم المرضى.

وعلاوة على ذلك, يمكن استخدام مستويات التعبير عن البروتين كمؤشر تشخيصي لعودة المرض وكمؤشر على الاستجابة للعلاج.

وتجدر الإشارة إلى أنه لتحليل المستخلصات البرازية لا يكون فحص بقعة ويسترن هو الوحيد الذي يمكن استخدامه. وفي الواقع قام المخترعون بتحويل اهتمامهم لتطوير بروتوكول تحليلي للكشف عن وجود الـ HMGB1 في البراز باستخدام اختبار ELISA, وباستخدام نفس الأجسام المضادة المستخدمة في فحص بقعة ويسترن الذي أعطى أكثر من نتيجة لائقة من حيث النوعية والحساسية للبروتين المستهدف. وبذلك, تتم طريقة الاجراء مع بناء معدات ELISA باستخدام اثنين من الأجسام المضادة المستخدمة فعلياً في الكشف عن البروتين بواسطة WB في عينات البراز. وإن الخيار بتزويد بروتوكول ELISA, بالإضافة إلى بقعة ويسترن, تمليه حقيقة أن هذه التقنية بسيطة وعلاوة على ذلك تسمح بقياس أفضل للتفاعل, وفي الواقع, تتناسب كثافة اللون في طبق ELISA مع عدد معقدات مولد مضاد–الجسم المضاد (الأولية) وبالتالي بتركيز المولد المضاد (القادر على الارتباط بالجسم المضاد الأولي) في العينة التي تم تحليلها.

قائمة المراجع

1. Wang et al. Am J Respir Crit Care Med. 30164:1768-73, (2001).
2. Fink et al. J Intern Med. 261:349-62, (2007)
3. Hirschfeld at al. J Immunol. 165:618-22, (2000)
4. Andersson et al. J Exp Med. 192: 565-570,(2000)
5. Scaffidi et al. Nature. 418:191-5, (2002)
6. Bianchi et al. J Leukoc Biol. (2009)
7. Taniguchi et al. Arthritis Rheum. 48:971-81, (2003)
8. Jiang et al. Ann Rheum Dis. 67:727-8, (2008)
9. Ulfgren et al. Arthritis Rheum. 50:1586-94, (2004)
10. Luan ZG et al. Pancreas 39:216-23 (2010)

11. Fink M. Crit Care Med (2009)

12. Yang R et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 297: R362-9 (2009)

13. Wu R et al. Crit Care Med 37:2483-5 (2009)

14. Liu S et al. Am J Physiol Cell Physiol 290: C990-9 (2006)

15 Sappington et al. Gastroenterology. 123:790-802, (2002)

16. Dave SH et al. J Leukoc Biol 86:633-43 (2009)

17. Maeda S et al. Biochem Biophys Res Commun 360:394-400 (2007)

18. Dai S et al. J Biol Chem 285:4995-5002. (2009)

19. Zamora R et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 289:G643-52 (2005)

20. Yang R et al. Mol Med 12:105:14 (2006)

21. Clynes R et al. Curr Mol Med 7:743-51 (2007)

22. Ito I et al. J Biol Chem 282:16336-44 (2007)

23. . Desai D et al. Aliment Pharmacol Ther 25:247-255 (2007)

24. Gisbert JP et al. Gastroenterol Hepatol 30:117-129 (2007)

25. Angriman I et al. Clin Chim Acta 381:63-68 (2007)

26. Tibble JA, Bjarnason I. Fecal Drugs Today (Bart) 37:85-96 (2001)

27. Vermeire S et al. Gut 55:426-431 (2006)

28. Sutherland AD et al. Dis Colon Rectum 51:1283-1291 (2008)

29. Gisbert JP, McNicholl AG. Dig Liver Dis 41:56-66 (2009)

30. Bousvaros A, Antonioli DA, Colletti RB et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr 44:653-74 (2007)

31. Hyams JS, Mandel F, Ferry GD, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr 12:439-47 (1991)

32. Turner D, Otley AR, Mack D, et al. Gastroenterology 133:423-32. (2007)

33. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. 20 Gastrointest Endosc 60:505-12 (2004)

34. Osada T, Ohkusa T, Yokoyama T, et al. Inflamm Bowel Dis 16:192-197 (2010)

35. Diamanti A, Panetta F, Basso MS et al. Inflamm Bowel Dis 16:1926-30 (2010)

عناصر الحماية

1 1- طريقة غير باضعة للكشف عن, تشخيص والتنبؤ بحالات التهاب الأمعاء في إنسان
2 مريض, تتميز بأنها تكشف عن مستوى HMGB1 في عينات البراز لنفس المريض.

1 2- طريقة حيث يستخدم الانخفاض في مستوى HMGB1 في عينة البراز كمؤشر استجابة
2 لمعالجة محددة.

1 3- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1, حيث يتم اختيار حالات التهاب الأمعاء المذكورة من
2 مجموعة تتكون من أمراض الأمعاء الالتهابية المزمنة (IBD), تحديداً مرض كرون
3 (CD) وقرحة القولون (UC).

1 4- الطريقة وفقاً لعنصري الحماية 1 و 2, حيث يكون الإنسان المريض هو طفل مريض
2 يعاني من IBD.

1 5- الطريقة وفقاً لعناصر الحماية السابقة حيث تتضمن الخطوات التالية:
2 ▪ قياس وزن عينة البراز وتعليقها في محلول استخلاص منظم لدرجة الحموضة
3 PBS,
4 ▪ طحن العينة والاستخلاص بعد عملية الطرد المركزي لخلاصة البراز الطافية,
5 ▪ تقييم تركيز البروتين بواسطة معايرة برادفورد,
6 ▪ تحليل خلاصة البراز بواسطة بقعة ويسترن.

1 6- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية السابق, حيث تتميز أنه أثناء تحليل المستخلصات بواسطة
2 بقعة ويسترن, يتم تحضين خلاصة البراز المنقولة على مرشح PVDF مع الجسم المضاد
3 لـِ HMGB1 متعدد النسائل أو وحيد النسيلة.

1 7- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية السابق، تتميز بأنه يتم إنتاج الجسم المضاد لـِ HMGB1
2 متعدد النسائل المذكور في الأرنب باستخدام ببتيد اصطناعي كمُستمنع مقابل للحمض

الأميني 165–180 في HMGB1 البشري، ويقابل الجسم المضاد لـِ HMGB1 وحيد النسيلة المذكور النسيلة 115603 في الورم الهجين الناتج من اندماج الورم النقوي الفأري مع الخلايا البائية التي تم الحصول عليها من فأر ممنع بالإشريكية القولونية التي تم الحصول عليها من بروتين HMGB1 بشري مأشوب.

8- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 5، تتميز بأنه يتم إجراء تحليل خلاصة البراز بمعايرة ELISA.

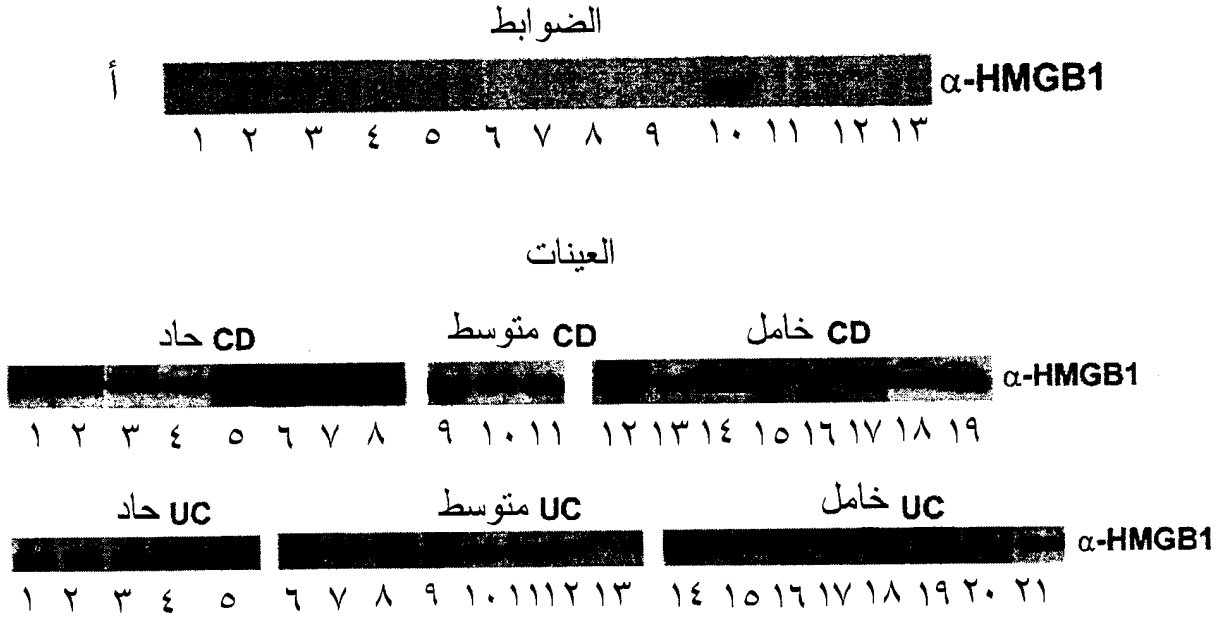
9- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية السابق، تتميز بأنه تستخدم نفس الأجسام المضادة المستخدمة في معايرة بقعة ويسترن كجسم مضاد في إجراء معايرة ELISA.

10- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية السابق، تتميز بأن الأجسام المضادة لـِ HMGB1 المستخدمة هي عبارة عن: جسم مضاد لـِ HMGB1 متعدد النسائل يتم إنتاجه في أرنب باستخدام ببتيد اصطناعي كمُستمنع مقابل للحمض الأميني 165–180 في HMGB1 البشري، وجسم مضاد لـِ HMGB1 وحيد النسيلة يقابل النسيلة 115603 في الورم الهجين الناتج من اندماج الورم النقوي الفأري مع الخلايا البائية التي تم الحصول عليها من فأر ممنع بالإشريكية القولونية التي تم الحصول عليها من بروتين HMGB1 بشري مأشوب.

11- طقم تحليل بقياس اللون للكشف عن بروتين HMGB1 في عينات براز بشرية وفقاً لطريقة عناصر الحماية السابقة، يعتمد على التفاعل نوعي بين مولد المضاد-الجسم المضاد، يتميز بأن الجسم المضاد المذكور يكون عبارة عن جسم مضاد لـِ HMGB1 متعدد النسائل أو جسم مضاد لـِ HMGB1 وحيد النسيلة.

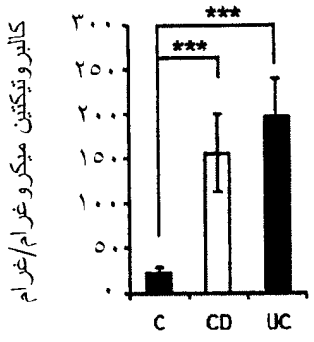
12- طقم التحليل بقياس اللون وفقاً لعنصر الحماية السابق، يتميز بأن الأجسام المضادة لـِ HMGB1 المستخدمة هي عبارة عن: جسم مضاد لـِ HMGB1 متعدد النسائل يتم إنتاجه في أرنب باستخدام ببتيد اصطناعي كمُستمنع مقابل للحمض الأميني 165–180 في HMGB1 البشري، وجسم مضاد لـِ HMGB1 وحيد النسيلة يقابل النسيلة 115603 في

الورم الهجين الناتج من اندماج الورم النقوي الفأري مع الخلايا البائية التي تم الحصول عليها من فأر ممنع بالإشريكية القولونية التي تم الحصول عليها من بروتين HMGB1 بشري مأشوب.

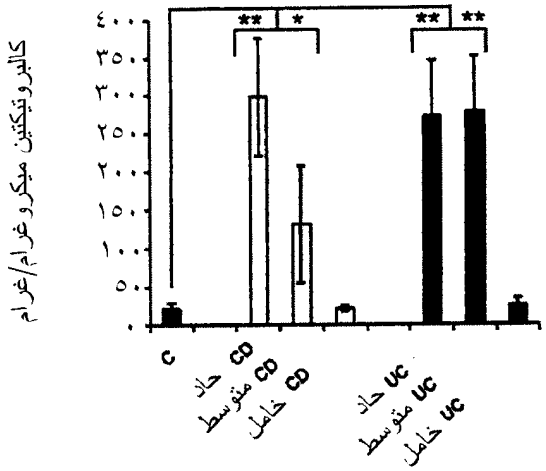

الضوابط
أ
α-HMGB1
١ ٢ ٣ ٤ ٥ ٦ ٧ ٨ ٩ ١٠ ١١ ١٢ ١٣
العينات
CD حاد
CD متوسط
CD خامل
α-HMGB1
١ ٢ ٣ ٤ ٥ ٦ ٧ ٨ ٩ ١٠ ١١ ١٢ ١٣ ١٤ ١٥ ١٦ ١٧ ١٨ ١٩
UC حاد
UC متوسط
UC خامل
α-HMGB1
١ ٢ ٣ ٤ ٥ ٦ ٧ ٨ ٩ ١٠ ١١ ١٢ ١٣ ١٤ ١٥ ١٦ ١٧ ١٨ ١٩ ٢٠ ٢١
ب
وحدات قياس كثافة HMGB1
٢٥٠٠٠٠
٢٠٠٠٠٠
١٥٠٠٠٠
١٠٠٠٠٠
٥٠٠٠٠
٠
***
***
C
CD
UC
وحدات قياس كثافة HMGB1
٣٥٠٠٠٠
٣٠٠٠٠٠
٢٥٠٠٠٠
٢٠٠٠٠٠
١٥٠٠٠٠
١٠٠٠٠٠
٥٠٠٠٠
٠
**
C
CD حاد
CD متوسط
CD خامل
UC حاد
UC متوسط
UC خامل

الشكل ١

أ


كالبروتيكتين ميكروغرام/غرام
٣٠٠
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
٠
***
***
C
CD
UC

ب


كالبروتيكتين ميكروغرام/غرام
٤٠٠
٣٥٠
٣٠٠
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
٠
**
*
**
**
C
CD حاد
CD متوسط
CD خامل
UC حاد
UC متوسط
UC خامل

الشكل ٢