گزارش پروژه درس مقدمه ای بر بیو انفورماتیک

ترم ۱۳۹۷۲

استاد: دکتر شریفی زارچی- دکتر کوهی

زمان انجام پروژه: ۱۵-۲۱ تیر۹۷

هدف :بررسی فاکتورهای رونویسی موثر در AML و فرایند ها و سیستم های مرتبط با آن در بدن.

نمونه ها به طور کلی در دو گروه نمونه های سالم و نمونه های مبتلا قرار می گیرند. داده خام ورودی ای که داریم در واقع یک ماتریس است .این ماتریس ۳۲۳۲۱ سطر دارد (که این تعداد ژن هایی است که قرار است تفاوت میانگین بیان آنها در نمونه های سالم و میانگین بیان آن ها در نمونه های مبتلا را پیدا کنیم و ژن هایی که این تفاوت در آنها بیشتر از بقیه است، یا حداقل تفاوتی معنا دار است را پیدا کنیم. منظور از معنادار این است که تفاوت به حدی باشد که بتوانیم نتیجه بگیریم که تغییر در پروتئین هایی که فاکتور رونویسی این ژن(ها) هستند باعث AML می شود، و یا بروز اتفاقات غیرعادی در pathway هایی که این ژن(ها) در آن قرار دارند باعث AML می شود و یا بالعکس. طبعا همین کم و زیاد شدن بیان ژن ها(ی) حاضر در pathway که باعث افزایش یا کاهش فرایندها می شود یک اتفاق غیرعادی است.) و ۱۷۰ ستون. (که این تعداد نمونه هایمان است) یعنی اگر این ماتریس را ex بنامیم (اسمی که در کد R استفاده شده) ex[i][j] برابر مقدار بیان ژن iام در نمونه jام است.

ابتدا باید داده ها را دانلود کنیم. با استفاده از تابع getGEO از کتابخانه GEOquery و ورودی دادن شماره دسترسی دیتاست، این کار را انجام می دهیم. پارامتر AnnotGPL را True می گذاریم تا بعدا ماتریس تفاوت بیان ها را بر اساس نوع پلتفرم بسازیم.

داده ای که دانلود و ذخیره کردیم (در متغیر gset) از نوع ExpressionSet است، شبیه اینکه لیستی از لیست ها داشته باشیم. طول این لیست برای داده ما ۱ است. اما ممکن بود نباشد. مثلا دیتاست هایی از نمونه های گونه های زیستی مختلف داشته باشیم و بخواهیم دیتاست نظیر یک گونه خاص را بدست بیاوریم از دستور grep استفاده می کنیم که بین دیتاست های موجود اندیس دیتاستی که نام آن با نام پلتفرم ما match می شود را پیدا کند. سپس دیتاستی که در آن اندیس از لیست است را می گیریم (gset را مساوی آن دیتاست می گذاریم) مثلا برای داده های ما اندیس متناظر با "GPL٦٢٤٤" را پیدا می کنیم که یکی از پلتفرم های تحلیل داده های گونه ی انسان است. اما چون طول ExpressionSet یک است همان دیتاست اندیس یکم را برمیداریم.

کنترل کیفیت داده:

حالا یک آرایه از string ها به طول تعداد نمونه ها ایجاد می کنیم که عضو iام آن، اسم گروهی است که نمونه iام به آن تعلق دارد. ("Normal" یا "AML"). با استفاده از تابع exprs از کتابخانه BioBase ماتریس ساده میزان بیان ژن ها در نمونه ها را از دیتاست استخراج می کنیم. اگر نمودار جعبه ای بیان ژن ها در هر نمونه را ببینیم مشاهده می کنیم که این نمودارها تقریبا مشابه هم هستند و تقریبا در همه ۱۷۰ نمونه میانه های گروه ژنها بر هم منطبق اند. یعنی اگر برای هر نمونه ژن ها را بر حسب میزان بیانشان مرتب کنیم و برای هر مقدار بیان یک فراوانی بدست بیاوریم و بر اساس آن نمودار میله ای بکشیم این نمودار ها تا حد زیادی بر هر منطبق اند. اگر نبودند باید با تابع normalizeQuantiles مقادیر را نرمال می کردیم. هم چنین مقادیر بیانها بین ۰ و ١٤ است که مقادیر لگاریتمی است و گرنه باید خودمان از آن ها log می گرفتیم.

حالا تابع cor(ex) ماتریسی ۱۷۰*۱۷۰ و متقارن به ما می دهد که در آن a[i][j] میزان همبستگی داده iام و داده jام است. با تابع pheatmap می توانیم برای این همبستگی نمودار بکشیم. این تابع نوعی گروه بندی هم انجام می دهد و داده های همبسته تر را کنار هم می گذارد. برای اینکه وضعیت همبستگی داده های سالم و مبتلا را با خودشان و با همدیگر ببینیم آرایه اسامی گروه های داده ها را به عنوان لیبل به سطرها و ستونهای heatmap می دهیم.

گروه بندی heatmap تقریبا خوب انجام شده و به جز یک مورد که سه تا داده AML بین ٦ تا داده نرمال قرار گرفته اند، در بقیه موارد داده های همگروه کنار همند. مشاهده می کنیم که "مربع" های همبستگی گروه های نرمال واضح تر و قرمزتر از گروه های

AML است. واقعا هم تنوع سلول ها در یک توده سرطانی زیاد است و خیلی عجیب نیست اگریک سلول سرطانی به یک سلول سالم شبیه تر باشد تا به یک سلول سرطانی دیگر در همان توده. دو نمونه داریم که تقریبا به هیچ نمونه دیگری شبیه نیستند. کلا heatmap نشان می دهد که بین نمونه های سالم و مبتلا تفاوت معنادار وجود دارد چون اگر داده رندم بگیریم احتمال اینکه مربع های گروه ها اینقدر واضح از مستطیل های اطرافشان پررنگ تر و متمایز باشند خیلی کم است.

کاش ابعاد داده:

حالا با استفاده از متد PCA ابعاد ژنها را کاهش می دهیم. با تابع prcomp از کتابخانه limma. خروجی این تابع حاصل ضرب یک ماتریس مربعی در ماتریس ورودیمان (ماتریس بیانها) است که k ستون اول آن تقریبا بهترین (یعنی نگهدارنده بیشترین تفاوتها) تصویر بردارهای سطرها (ژنها) روی فضای k بعدی است. این ماتریس مولفه "x" خروجی تابع است. ماتریس مربعی ای که ضرب می شود هم مولفه "rotation" آن است. حالا اگر نمودار دو ستون اول را بیاوریم که بهترین تصویر روی فضای دوبعدی است، ژنها به شکل یک توده کشیده در می آیند چون مولفه اول درواقع همان میزان بیان ژنهاست. یعنی یک بعد ما صرف این شده که ژنها را برحسب میزان بیان sort کنیم و ژنهای housekeeping موجود در همه سلول ها را یک سر نمودار ببینیم و ژنهای کمیاب را در سر دیگر. پس میزان بیان ژن ها را scale می کنیم و میانگین آن را روی صفر میگذاریم تا به جای مقدار مطلق بیان، اختلاف میزان بیان ژن ها از میانگین میزان بیان را داشته باشیم. چون scale فقط روی ستونهای ماتریس کار میکند باید ترانهاده ماتریس بیان را به آن بدهیم که ژنها در آن به جای سطرها، ستونهای ماتریسند. بعد از این کار وقتی نمودار می کشیم، نمودار دایره ای و متوازن می شود.

حالا برای کاهش ابعاد خود نمونه ها، سه ستون اول ماتریس "rotation" را می گیریم. (چون نمونه ها درواقع محورهای مختصاتی بودند که ژنها بردارهایی با مولفه های آنها بودند و ما با ضرب کردن ماتریس "rotation" در واقع پایه ی جدید برای فضای ژن ها تعریف کردیم) حالا نمونه ها را در یک نمودار می آوریم و با دادن آرایه گروه ها به عنوان ورودی تابع ggplot به نمونه های هر گروه یک رنگ می دهیم.

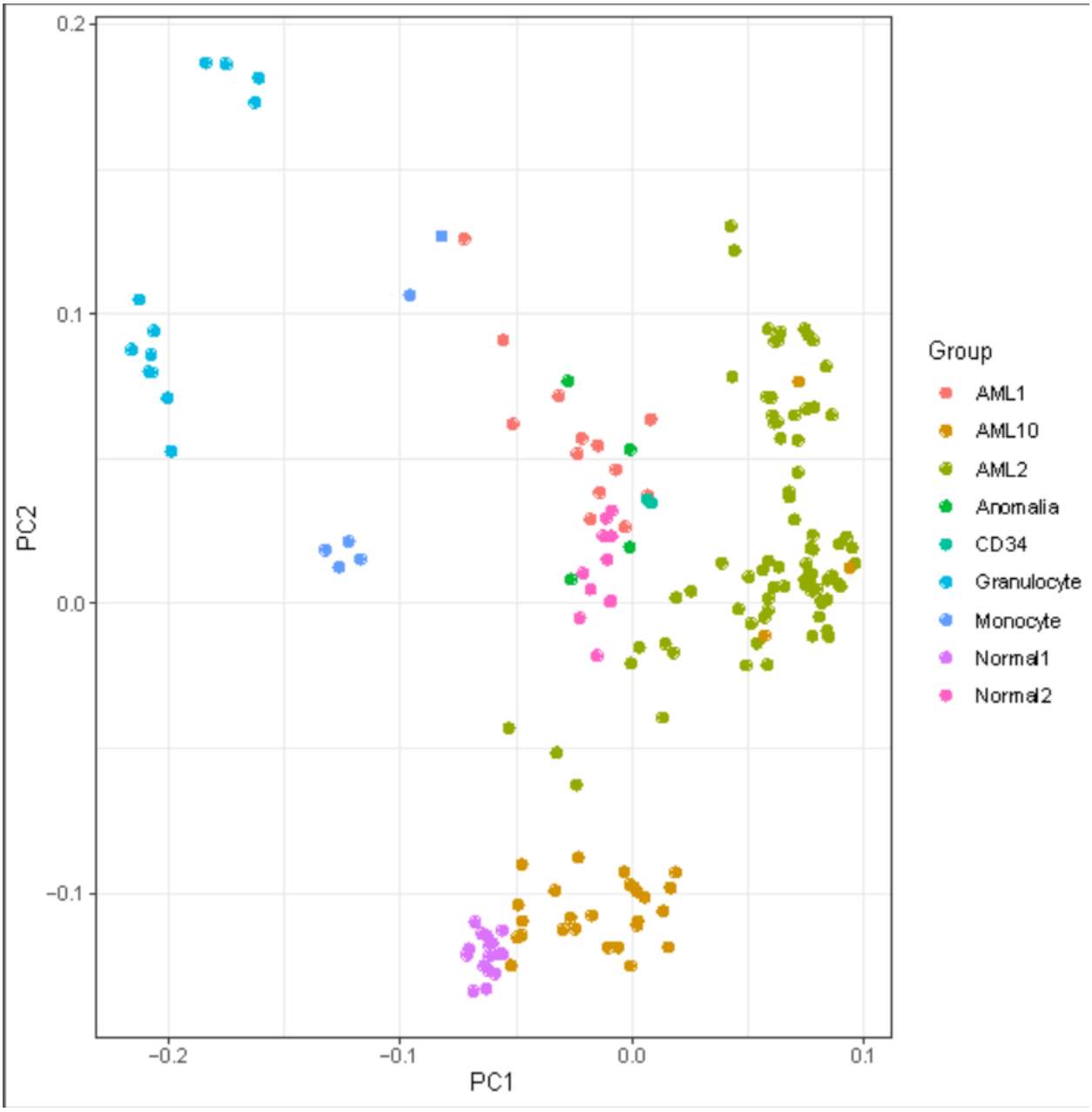
بررسی همبستگی بین نمونه ها:

مشاهده می کنیم که داده های سالم در ٤ بخش و داده های مبتلا در ٣ بخش قرار می گیرند. اگر بر اساس توضیحات دیتاست در سایت، گروه بندی ها را کمی جزیی تر کنیم مشاهده می کنیم که داده های سالمی که به سمت چپ نمودار چسبیده اند نمونه های Granulocyte هستند. گروه ٤ تایی ای که در سمت راست آنهاست و دو داده سالمی که در بالا به داده های مبتلا نزدیکند داده های Monocyte هستند. این دو گروه نسبتا به هم نزدیکند (چون هردو گلبول های سفیدی هستند که احتمالا مستقیما از خون افراد گرفته شده اند)

در گونه های مبتلا ١٣ گونه اول چون سلول های اولیه (primary) هستند جدا از ٢٤ سلول AML بعدی قرار می گیرند که مدتی به صورت cell line تحت شرایط کنترل شده نگهداری شده اند. دو تا از داده های سالم که بین داده های AML بودند و دو تا از داده های AML که بین داده های سالم بودند را داده غیرعادی گرفتیم. در heatmap مشاهده می شود که یکی از آنها داده اول heatmap است که به هیچ گروهی شبیه نیست.

به طور کلی به جز مرز بین گروه Normal٢ و AML١ در شکل زیر، در سایر نمونه ها مرز سالم ومبتلا به طور رضایت بخشی قابل تشخیص است.

به جز granulocyte و monocyte سایر داده های سالم در دو گروه قرار گرفته اند که هرکدام با یک گروه از داده ها AML مجاورند. این دو گروه AML این ویژگی را دارند که نمونه سلول های اولیه هستند در حالی که گروه سوم داده های AML که به هیچ گروه سالمی نزدیک نیستند اکثریت قریب به اتفاقشان این ویژگی را دارند که cell line بوده اند و در محل خارج از بافتی که به آن تعلق دارند هم قرار گرفته بودند. شاید این به خاطر مشکل داده های cell line است که درعین اینکه نگهداری آنها آسان تر و رشد دادن آن آسان تر از سلول اولیه است و برای تحقیقات بلند مدت و مقایسه تحقیقات با کارهای پیشین مناسب تر است اما ممکن است پس از مدتی در آن تغییراتی ایجاد شود و دیگر دقیقا نشان دهنده و نماینده سلول های بافتی که به آن تعلق دارد نباشد. (منبع)



بررسی تمایز در بیان ژنهای نمونه ها:

حالا برای اینکه برای هر ژن تفاوت لگاریتمی میانگین بیانش به همراه p-value (احتمال اینکه این ژن به بیماری ربطی نداشته باشد و باز هم همین اختلاف یا اختلاف چشمگیرتر را ببینیم) از کدی که در قسمت GEO۲R بخش R script در صفحه نمونهها قرار داده شده استفاده می کنیم. فقط به جای گروه های داده شده در سایت، آرایه گروه های خودمان را به صورت factor شده می گذاریم. این کد جدولی به ما می دهد که جلوی ID و نام هر ژن تفاوت بیان و logFC و p-value و موارد دیگری که ما فعلا لازم نداریم را نوشته. پس همین ستون هایی که برایquery زدن در قسمت بعد به آن نیاز داریم را می زنیم.

حالا ژن هایی که تفاوت لگاریتمی بزرگتر از ۱ و p-value کوچکتر از ۰/۰۵ دارند را انتخاب می کنیم و در یک فایل تکست میریزیم. همین کار را برای تفاوت لگاریتمی کوچکتر از ۱- هم تکرار می کنیم. دسته اول ژنهایی هستند که احتمالا زیاد شدنشان در AML نقش دارد، یا بیماری در زیاد شدنشان نقش دارد، و دسته دوم برعکس هستند. مثلا به دسته اول می گوییم Up_Genes و ته دسته دوم می گوییم Down_Genes

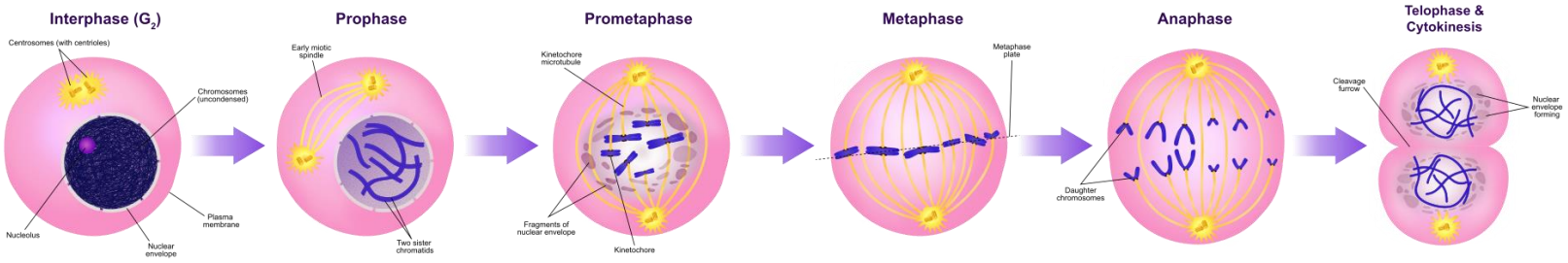
Pathway Analysis و Gene Ontology:

حال به سایت Enrichr می رویم و همه Up_Genes را در فیلد ورودی صفحه اول آپلود می کنیم. اول transcription factorهایی که برای تعداد بیشتری از Up_Genes نقش transcription factor را دارند می بینیم. در اینجا ۵ فاکتور تاثیرگذار NRF۱, E۲F٤, E۲F۱, HIF۱A, CRX هستند.

اما اینکه این ژن ها در چه pathwayهایی وجود دارند، طبق پایگاه داده Reactome ۲۰۱٦ ، ۱۰ pathway اول عبارتند از:

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
۱	Cell Cycle_Homo sapiens_R-HSA-۱٦٤۰۱۷۰	٥,۹٤٤e-۱۰۱	٦,٦۷٦e-۹۸	-۲,٤٦	٥٦۷,۹۷
۲	Cell Cycle, Mitotic_Homo sapiens_R-HSA-٦۹۲۷۸	٥,۰۰۹e-۸۹	۲,۸۱۲e-۸٦	-۲,٤۷	٥۰۱,۷۹
۳	M Phase_Homo sapiens_R-HSA-٦۸۸۸٦	۱,٤۹۳e-٤٦	٥,٥۹۰e-٤٤	-۲,٤۳	۲٥٦,٦۲
٤	Cell Cycle Checkpoints_Homo sapiens_R-HSA-٦۹٦۲۰	۲,۲۰۸e-۳۹	٤,۹٦۰e-۳۷	-۲,۳۳	۲۰۷,۷٦
٥	Chromosome Maintenance_Homo sapiens_R-HSA-۷۳۸۸٦	۱,٦۰٦e-٤۱	٤,٥۰۸e-۳۹	-۲,۰٥	۱۹۲,۷۸
٦	G۲/M Checkpoints_Homo sapiens_R-HSA-٦۹٤۸۱	۱,۰۹۱e-۳٦	۲,۰٤۳e-۳٤	-۲,۳۱	۱۹۱,۰۷
۷	DNA Repair_Homo sapiens_R-HSA-۷۳۸۹٤	۲,۷۲۹e-۳۲	٤,۳۷۹e-۳۰	-۲,۲۳	۱٦۱,۷٥
۸	Mitotic Metaphase and Anaphase_Homo sapiens_R-HSA-۲٥٥٥۳۹٦	٥,٦۹۰e-۲۹	٤,۲٦۰e-۲۷	-۲,۲۳	۱٤٥,۰۱
۹	RHO GTPase Effectors_Homo sapiens_R-HSA-۱۹٥۲٥۸	۱,٦۰٦e-۲۹	۱,٥۰۳e-۲۷	-۲,۱۸	۱٤٤,۲۷
۱۰	Mitotic Prometaphase_Homo sapiens_R-HSA-٦۸۸۷۷	۷,۲۸۷e-۳۲	۱,۰۲۳e-۲۹	-۱,۹۹	۱٤۲,۷۲

مشاهده می کنیم که بیشتر این pathwayها به فاز تقسیم سلول ها و قسمت های بررسی (checkpointها) بین این فازها و نگهداری و ترمیم DNA مربوط می شود.Pathway شماره ٥ مربوط به نگهداری کروموزوم از طریق حفظ تلومر و نگهداری کروماتین است و Pathway شماره ۹ هم مربوط به کنترل ساختار سیتوپلاسمی، ترافیک درون سلولی و رونویسی DNA است.



مثلا pathway شماره ٦ مربوط به بازرسی قبل از مرحله ٦ (سمت راست) در شکل بالاست.

Gene Ontology:

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
۱	DNA metabolic process (GO:۰۰۰۶۲۵۹)	۲,۵۷۸e-۴۱	۹,۰۲۵e-۳۸	-۱,۳۶	۱۲۷,۴۵
۲	DNA repair (GO:۰۰۰۶۲۸۱)	۷,۹۴۷e-۲۹	۱,۳۹۱e-۲۵	-۱,۷۱	۱۱۰,۶۹
۳	DNA replication (GO:۰۰۰۶۲۶۰)	۱,۸۷۳e-۲۵	۲,۱۸۵e-۲۲	-۱,۵۵	۸۸,۵۳
٤	chromatin remodeling at centromere (GO:۰۰۳۱۰۵۵)	٦,۸۵۸e-۱۷	۳,٤۳۰e-۱٤	-۲,۲۹	۸۵,۲۹
٥	CENP-A containing nucleosome assembly (GO:۰۰۳٤۰۸۰)	۲,۱۲۹e-۱٦	٦,۷۷٦e-۱٤	-۲,۱۱	۷٦,۱۹
٦	CENP-A containing chromatin organization (GO:۰۰٦۱٦٤۱)	۲,۱۲۹e-۱٦	٦,۷۷٦e-۱٤	-۲,۰۹	۷٥,۳۱
۷	histone exchange (GO:۰۰٤۳٤۸٦)	۱,۳٦۲e-۱٦	٥,۳۳۳e-۱٤	-۱,۹٦	۷۱,٤۹
۸	regulation of mitotic cell cycle phase transition (GO:۱۹۰۱۹۹۰)	۱,۳۷۱e-۱٦	٥,۳۳۳e-۱٤	-۱,۹۱	٦۹,۷۲
۹	centromere complex assembly (GO:۰۰۳٤٥۰۸)	٦,۸٦۷e-۱۸	٤,۰۰۷e-۱٥	-۱,۷۰	٦۷,۲٦
۱۰	double-strand break repair (GO:۰۰۰٦۳۰۲)	۲,۲۳۳e-۱٥	٥,۲۱۳e-۱۳	-۱.۹۳	٦٥,۱۷

باز هم مورد اول مربوط به سنتز و نابودی DNA در فرایند های تکثیر و تعمیر آن است. مورد چهارم در کنترل بیان ژن و بازنویسی DNA نقش دارد. مورد هفتم جابجایی هیستون ها (پروتئین های گرد که دور هر ۸ تای آن ۱/۵ دور DNA پیچیده شده است) با یکدیگر در یک چرخه و نگهداری DNA است. مورد نهم هم مربوط به یکی از فرایندهای نگهداری DNA است.

اینجا بیشتر فرایندهایی دیده می شوند که در نگهداری DNA به صورت واحد های Nucleosome نقش دارند. باز هم تکثیر سلول و DNA و تعمیر DNA دیده می شود. به طور کلی به نظر می رسد AML در فرایند تکثیر سلولی خلل ایجاد می کند و باعث می شود سلول هایی با DNA آسیب دیده به وجود بیایند و تکثیر شوند.

به طور کلی AML نتیجه یک پروسه تغییرات چند مرحله ای از سلول های نیمه تمایز یافته (precursor) است که آن ها را قادر می سازد تا از تعداد نامحدودی چرخه تقسیم سلولی جان سالم به در ببرند و نسبت به مرگ سلولی مقاوم شوند. اینکه checkpointها بین مراحل تقسیم سلولی کار خود را به درستی انجام ندهند و نتوانند DNA ای که درست تکثیر نشده را تشخیص بدهند یا سیگنال توقف تقسیم سلول تا زمان اصلاح آن DNA را بدهند (منبع)

همین کارها را برای Down_Genes تکرار می کنیم.

Transcription factorهای بیشترین ژن ها با بیان پایین: SPI۱, FOS, MIR۱۳۳B, JUN, SEBPB

Pathwayها:

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
۱	Th۱۷ cell differentiation	۸,٦٤۷e-۲۱	۷,۸٦۹e-۱۹	-٦۸,٥٤	۳۱٦٦,۲٦
۲	Intestinal immune network for IgA production	۱,۰۲۸e-۱۲	۱,۰۸۰e-۱۱	-۹۰,۷۹	۲٥۰٦,۱۹

۳	Graft-versus-host disease	٦,٤٠٨e-١٧	١,٤٥٨e-١٥	-٦٧,٠٤	٢٤٩٩,٨٤
٤	Autoimmune thyroid disease	١,٣٣٤e-١٣	١,٥١٧e-١٢	-٧٤,٠٢	٢١٩٤,٤٦
٥	Allograft rejection	١,٠٠٥e-١٦	٢,١١٠e-١٥	-٥٢,٦٤	١٩٣٩,١٢
٦	TNF signaling pathway	٨,٢٣٣e-١٣	٨,٩٩١e-١٢	-٦٤,٣٣	١٧٨٩,٩٤
٧	Inflammatory bowel disease (IBD)	٤,٧٩٢e-١٩	٢,٤٦٤e-١٧	-٤٢,٣٧	١٧٨٧,٠٦
٨	Legionellosis	١,٦٩٢e-٩	١,٤٠٠e-٨	-٧٨,٣٧	١٥٨٢,٨٤
٩	Asthma	١,٨٠١e-٨	١,٣٢٩e-٧	-٧٤,٢٦	١٣٢٤,٢٨
١٠	Osteoclast differentiation	٤,٠٨٦e-١٩	٢,٤٦٤e-١٧	-٢٩,٩٤	١٢٦٧,٨٩

اینجا تنوع pathwayها بیشتر است، ولی باز هم ویژگی های مشترک وجود دارد: سیستم ایمنی (١، ٢، ٣، ٤، ٥ ، ٦)، مشکلات تنفسی(٨(ذات الریه) و ٩)، التهاب(٦،٧)، روده کوچک و بزرگ (٢،٧) و حمله سیستم ایمنی به سلول های خودی (٣،٤،٥).

:Ontology Analysis

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Z-score	Combined score
١	neutrophil degranulation (GO:٠٠٤٣٣١٢)	٢,٠٧٧e-٤١	٣,٧٩٦e-٣٨	-٢,٠٢	١٨٨,٨٦
٢	neutrophil mediated immunity (GO:٠٠٠٢٤٤٦)	٦,٢٢٥e-٤٢	٢,٢٧٥e-٣٨	-١,٩٥	١٨٤,٦٩
٣	cytokine-mediated signaling pathway (GO:٠٠١٩٢٢١)	٨,٠٦٤e-٣٩	٧,٣٦٨e-٣٦	-١,٣٤	١١٧,٧٩
٤	neutrophil activation involved in immune response (GO:٠٠٠٢٢٨٣)	٥,٦٧٩e-٤١	٦,٩١٩e-٣٨	-١,٢٥	١١٥,٧٩
٥	positive regulation of cytokine production (GO:٠٠٠١٨١٩)	٣,٢٨٠e-٢١	١,٩٩٨e-١٨	-١,٩٥	٩٢,١٨
٦	cellular response to interferon-gamma (GO:٠٠٧١٣٤٦)	٨,٩٣٧e-٢١	٤,٦٦٦e-١٨	-١,٩٩	٩١,٩٧
٧	type I interferon signaling pathway (GO:٠٠٦٠٣٣٧)	١,٠٢٥e-١٥	٣,١٢٢e-١٣	-٢,٣١	٧٩,٦٥
٨	interferon-gamma-mediated signaling pathway (GO:٠٠٦٠٣٣٣)	١,٩٩٧e-٢٦	١,٤٦٠e-٢٣	-١,٣١	٧٧,٣٨
٩	inflammatory response (GO:٠٠٠٦٩٥٤)	٣,٦٢٥e-١٩	١,٦٥٦e-١٦	-١,٧٨	٧٥,٧٠
١٠	regulation of immune response (GO:٠٠٥٠٧٧٦)	١,٢٧٥e-١٨	٥,١٧٦e-١٦	-١,٢٨	٥٢,٨٦

در اینجا هم نوتروفیل یک گلبول سفید و عضو سیستم ایمنی است و مورد (١،٢،٤،٩،١ به سیستم ایمنی مربوطند. مورد ٣و٥و٦و٧و٨ هم به پروتئین هایی که به سلول ها سیگنال های مختلف می دهند (cytokine و یکی از انواع آن، interferon) مربوطند.

چالش ها:

همان طور که دیدیم تنوع در نمونه های مبتلا زیاد است. و تغییرات ژن ها که باعث AML می شود هم متنوع است. (بخشی از یک کروموزوم به یک کروموزوم دیگر بچسبد، indel اتفاق بیفتد یا یک کروموزوم یا تکه کروموزوم اضافی در سلول باشد) بعضی از این جهش ها قبل از تولد رخ می دهند اما بیشترشان بعد از تولد اتفاق می افتند. می دانیم عوامل خارجی مثل تشعشعات رادیواکتیو یا

مواد شیمیایی مثل بنزن یا شیمی درمانی های قبلی در AML موثرند، اما در بسیاری از موارد علت نامعلوم است، اما مثلا می دانیم که هر چه سن بالاتر می رود احتمال ابتلا به AML بیشتر می شود.(منبع)

با توجه به اینکه علت بیماری هنوز در بسیاری موارد معلوم نیست، شاید آنالیز داده ها با داشتن اطلاعاتی مثل محل زندگی و شغل کسی که نمونه را داده یا عادت های غذایی (مثلا در آزمایش خون این افراد چه فاکتورهایی بالا یا پایین بوده) مفید باشد. ممکن است شرایط اقلیمی/ آلودگی هوا/ فشار عصبی شغل/مواد غذایی در بیماری موثر باشد.