

مقاله پژوهشی

بررسی پلی مورفیسم ژن گیرنده اینترفرون گاما در بیماران ایرانی مبتلا به سل ریوی

محمد مهدی بانوئی^{۱*}، بهارک هوشیارکاشانی^۱، مهدی میرسعیدی^۲، مسعود هوشمند^۱، پیام طبرسی^۲، لاله زرگر^۲، مجید ولی اله پور امیری^۲، داوود منصوری^۲، محمد حسین صنعتی^۱، محمد رضا مسجدی^۲

۱- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران ۲- مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سل از بیماری‌های عفونی شایع در جهان است. در طی سال‌های اخیر، نگرش نوینی، با نام استعداد ژنتیکی، به عنوان یک علت زمینه‌ساز در فعالیت مجدد سل مطرح شده است. یکی از ژن‌های مورد نظر پژوهشگران ژن گیرنده شماره ۱ اینترفرون گاما است. هدف این مطالعه، تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم ژن گیرنده شماره ۱ اینترفرون گاما و استعداد ابتلا به سل بود. در این پژوهش، ۵۰ بیمار مبتلا به سل ریوی با اسمیر مثبت خلط که به صورت تصادفی ساده انتخاب شده بودند، با ۵۴ فرد سالم انتخاب شده از اقوام بیماران مقایسه شدند. در تمام این بیماران پلی مورفیسم ژن IFN- γ R1 بررسی شد. میانگین سن (\pm انحراف معیار) در گروه بیماران ۵۵ \pm ۲۰ و در گروه شاهد ۵۰ \pm ۱۴ سال بود. تنها در یک نفر از بیماران آلل مربوط به ژن گیرنده اینترفرون گاما جهش داشت و در نتیجه اختلاف آماری معنی داری بین دو گروه دیده نشد. بنابراین استعداد ژنتیکی ابتلا به سل به ژن IFN- γ R1 مرتبط نبود.

واژه‌های کلیدی: ژن رسپتور اینترفرون گاما، پلی مورفیسم، سل ریوی

مقدمه

شده است. اولین بار افزایش حساسیت^۱ به عفونت مایکوباکتریومی با یافتن جهش در ژن گیرنده شماره ۱ اینترفرون گاما (IFN- γ R1) در یک کودک مبتلا به عفونت منتشر با BCG^۲ مطرح شد (۷). سپس نقص‌های جدید در ژن سیتوکین‌های مختلف، هم چون IL-12p40، STAT-1 و IFN- γ R2، IL-12RB1 و نادر بوده اند (۱ تا ۸). یک مورد عفونت با مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در بیمار دچار نقص در ژن IFN- γ R1 نیز گزارش شده است. به نظر می‌رسد که عفونت‌های مایکوباکتریومی در افراد دچار این جهش‌ها با شدت بیشتری رخ می‌دهند. تأیید اطلاعات بالا به مطالعه بیماران مسلول، از نظر پلی مورفیسم ژنتیکی، خصوصاً در ژن IFN- γ R1، نیاز دارد.

سل یکی از بیماری‌های عفونی شایع در جهان است. بیش از یک سوم جمعیت جهان به باسیل مایکوباکتریوم توبرکولوزیس آلوده‌اند (۱)، درحالی که تنها سالانه حدود هشت میلیون نفر مبتلا به سل ریوی گزارش می‌شوند (۲). از مدت‌ها پیش علت اینکه همه افراد آلوده، به سل فعال مبتلا نمی‌شوند، بررسی شده و عوامل خطرناک متعددی برای فعالیت مجدد سل پیشنهاد شده‌اند. نقص ایمنی اکتسابی، سن بالا، مصرف الکل و سیگار، استفاده از کورتیکواستروئیدها، دیابت و سوء تغذیه از جمله این عوامل هستند (۳ تا ۶). در ده سال گذشته نگرش نوینی با نام استعداد ژنتیکی، نیز به عنوان عامل زمینه‌ساز فعالیت مجدد سل مطرح

*محمد مهدی بانوئی

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۶۳۴۳
E.mail: mmbanoei@yahoo.com تلفن: ۰۲۰-۳۰۱۰۴۵۸۰ / فاکس: ۰۲۰-۳۰۱۰۴۵۸۰

1. Hyper susceptibility

2. Bacillus Calmette-Guérin

هدف این مطالعه تعیین ارتباط جهش در ژن گیرنده شماره ۱ اینترفرون گاما و ابتلا به سل ریوی بود.

روش کار

این مطالعه به صورت مورد-شاهدی طراحی شد. مطالعه از نظر رعایت اصول اخلاق پزشکی توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب شد. تمام افراد بررسی شده ملیت ایرانی داشتند که طبق تعریف شامل هر فردی بود که خود او و پدر و مادرش متولد ایران بودند. در این مطالعه افراد دچار علائم بالینی (سرفه بیش از ۳ هفته، خلط، هموپتیژی همراه تب، تعریق شبانه و کاهش وزن) و شواهد رادیولوژیک (وجود کانسولیداسیون^۳ \pm کاویته، خصوصاً در لوب‌های فوقانی) منطبق با سل ریوی که توسط پزشک متخصص بیماری‌های عفونی مشکوک به سل تشخیص داده شده بودند، بررسی شدند. در این میان، افرادی که آزمایش خلط آنها در رنگ آمیزی به روش زیل-نلسون^۴، حداقل در دو نوبت، باسیل اسید فاست^۵ را نشان داده بود و در کشت خلط به روش لون اشتاین^۶ - جنسن، مایکوباکتریوم توبرکولوزیس رشد کرده بود، بیمار مبتلا به سل ریوی اسمیر مثبت در نظر گرفته شدند. افراد زیر ۱۵ سال و بیمارانی که دچار بیماری همراه مستعدکننده سل، مانند عفونت HIV / ایدز، دیابت، سیروز کبدی، نارسایی مزمن کبدی، مصرف داروهای تضعیف کننده ایمنی، پیوند عضو و سرطان، جز کارسینوم سلول بازال (BCC)، بودند از مطالعه خارج شدند. با معیارهای بالا ۵۰ بیمار به طور تصادفی ساده انتخاب شدند. ابتدا رضایت نامه شفاهی و کتبی ورود به مطالعه دریافت شد و سپس اطلاعات زمینه‌ای (نژاد، سن و جنسیت) در پرسشنامه اختصاصی ثبت شد. ۵۴ فرد سالم نیز به طور تصادفی از میان اقوام افراد مراجعه کننده، به عنوان شاهد، انتخاب شدند.

برای استخراج DNA، از هر فرد ۱۰ میلی لیتر خون وریدی در ماده ضد انعقاد EDTA^۷ جمع آوری شد. DNA به روش نمک اشباع^۸ و کیت شرکت QIAGEN (آلمان) استخراج شد.

DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی زیر و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد:

5'GTAAAGCCAGGGTTGGACA3'

5'CATCTCGGCATACAGCAAATTCCTGT3'

واکنش مربوط در حجم ۲۵ میکرومول، حاوی ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۳/۲ میلی مول کلرید منیزیم و ۲۰۰ میلی مول dNTP، به همراه یک واحد از آنزیم پلیمرز انجام شد. نمونه‌های آماده شده ابتدا در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و سپس در ۳۲ سیکل در ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۵۹°C به مدت ۱ دقیقه، ۷۳°C به مدت

۱ دقیقه و در نهایت، در دمای ۷۳°C به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر شدند. محصول واکنش با استفاده از پرایمرهای ذکر شده دارای طول ۷۰ نوکلئوتید بود که با بارگذاری بر روی ژل آگارز ۳٪، جهت تأیید انجام واکنش، مشخص می شدند. با توجه به توالی پرایمر معکوس^۹، آنزیم برش دهنده Tsp451 می تواند توالی GTGAC یا GTGAC را شناسایی و در این منطقه برشی ایجاد کند. هرگاه جهشی در نوکلئوتید ۳۹۵ روی دهد و نوکلئوتید A جایگزین نوکلئوتیدهای C یا G شود، این جایگاه برش از بین می رود و آنزیم قادر نخواهد بود تا قطعه محصول واکنش را ببرد. بنابراین در افراد سالم قطعه ۷۰ نوکلئوتیدی، پس از انجام RFLP^{۱۰} به دو قطعه ۳۰ و ۴۰ نوکلئوتیدی تبدیل می شود. در صورت وجود جهش در ژن مربوط، چنانچه فرد هتروزیگوت باشد، این الگوی برش به صورت یک قطعه ۷۰ نوکلئوتیدی، یک قطعه ۴۰ نوکلئوتیدی و یک قطعه ۳۰ نوکلئوتیدی خواهد بود. در صورتی که فرد در مورد این جهش هوموزیگوت باشد، تنها یک قطعه ۷۰ نوکلئوتیدی دیده می شود. لازم به ذکر است که واکنش RFLP پس از اضافه کردن آنزیم NMU که ایزوشیزومر^{۱۱} (جفت‌های آنزیمی از انواع آنزیمهای برش دهنده که یک شبانه روز انجام شناسایی می کنند) آنزیم Tsp451 است، به مدت یک شبانه روز انجام شد و محصول هضم بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ بارگذاری شد و سپس با رنگ آمیزی نیترات نقره و اتیدیم بروماید^{۱۲}، قطعات به دست آمده بررسی شدند.

داده‌های تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS 11.0 تحلیل شدند. متغیرهای اسمی با آزمون مجذور کای و در صورت لزوم با آزمون دقیق فیشر، بررسی شدند. برای مقایسه متغیرهای کمی از آزمون T استفاده شد. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین سن (\pm انحراف معیار) در بیماران ۵۵ \pm ۲۰ و در گروه شاهد ۵۰ \pm ۱۴ سال ($p > 0/05$) بود. در گروه بیماران ۲۶ و در گروه شاهد ۲۵ زن (به ترتیب ۵۲٪ و ۴۶٪) حضور داشتند ($p > 0/05$). توزیع نژادی نیز در دو گروه اختلاف آماری معنی داری را نشان نداد ($p > 0/05$).

در بررسی RFLP ژن IFN- γ R1 در لوکوس ۳۹۵، در میان بیماران یک نفر دچار جهش تشخیص داده شد در گروه شاهد هیچ جهشی دیده نشد. به این ترتیب اختلاف آماری معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد ($p > 0/05$).

- | | |
|--|---------------------------|
| 3. Consolidation | 4. Ziehl-Neelsen Staining |
| 5. Acid Fast Bacillus | 6. Löwenstein-Jensen |
| 7. Ethylen Diamin Tetraacetic Acid | 8. Salting out |
| 9. Reverse | |
| 10. Restriction Fragment Length Polymorphism | |
| 11. Isoschizomer | 12. Ethidium Bromide |

بحث

ژن، شامل پروموتور، اینترون‌ها و اگزون‌های مختلف بررسی شد و در نتیجه احتمال وجود منطقه‌ای خاص که عامل استعداد به عفونت باشد، اندک است. در هر حال ممکن است استعداد ابتلا به سل با مناطق دیگری از ژن اینترفرون گاما و گیرنده‌ها مرتبط باشد که در هیچ کدام از این مطالعات ارزیابی نشده است. در مطالعاتی که در مورد ترشح سیتوکین‌ها از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بیماران مسلول و افراد سالم ایرانی انجام شد، مقدار ترشح IFN- γ در پاسخ به آنتی‌ژن در افراد مسلول به طور معنی‌داری بالاتر از افراد سالم بود (۱۸). به این ترتیب احتمالاً مشکلی در پاسخ ایمنی سلولی و ترشح کافی IFN- γ وجود ندارد (۱۹).

اما کفایت ساختار پروتئینی IFN- γ به بررسی بیشتری نیاز دارد و بررسی ژنتیکی IFN- γ را پیشنهاد می‌کند. اخیراً چند مطالعه در مورد احتمال استعداد ژنتیکی ابتلا به سل با جهش ژن IFN- γ انجام و نشان داده شده است جهش در منطقه +874 A/T SNP که در منطقه اینترون اول این ژن واقع است، با افزایش استعداد ابتلا به سل همراه بوده است (۱۹ تا ۲۱). به نظر می‌رسد همان‌گونه که بلامی^{۱۵} و همکارانش نشان دادند، استعداد ژنتیکی عموماً ناشی از همراهی چند ژن است و احتمال ارتباط این استعداد با پلی‌مورفیسم یک ژن تنها اندک است (۲۲). در بیماری سل نیز احتمالاً پلی‌مورفیسم ژن‌های متعدد سیتوکینی، گیرنده‌ها و پروتئین‌های داخل سلولی، خصوصاً در داخل ماکروفاژها، عامل استعداد ژنتیکی است.

در مطالعه‌ای که بر روی موارد BCGiosis و نقص‌های ایمنی آنها انجام شده است، یک مورد نقص در گیرنده شماره ۲ اینترفرون گاما یافت شد اما موردی از نقص گیرنده شماره ۱ گزارش نشد. هر چند که در آن مطالعه، تعداد ناچیزی از بیماران به‌طور ژنتیکی بررسی شده بودند (۲۳). در مجموع، مطالعه ما نشان داد جهش در منطقه ۳۹۵ ژن IFN- γ R1 عامل استعداد ژنتیکی ابتلا به سل نیست.

اینترفرون گاما عامل تحریک فعالیت سلولی با اتصال به مجموعه گیرنده است. این گیرنده دو واحد دارد: واحد ۱ گیرنده اینترفرون گاما (IFN- γ R1) و یک عامل فرعی که توسط کروموزوم ۲۱ رمزگذاری می‌شود (IFN- γ R2) (۱۴). جهش در ژن گیرنده شماره ۱ اینترفرون گاما، در ناحیه ۳۹۵ سبب ایجاد کتون توقف می‌شود و پروتئین ساخته‌شده فاقد فعالیت کافی در منطقه اتصال غشائی است (۱۳) و در نتیجه فرد مستعد ابتلا به عفونت‌های داخل سلولی، مایکوباکتریومی، باکتریایی، انگلی و قارچی می‌شود (۱۵).

در مطالعه ما نشان داده شد که جهش در ژن گیرنده شماره ۱ اینترفرون گاما (IFN- γ R1) در منطقه ۳۹۵ که بیشتر در یک خانواده مالتایی سبب افزایش حساسیت به عفونت مایکوباکتریومی شده بود، عامل استعداد به سل در بیماران ایرانی مسلول ریوی نیست. فقدان چنین ارتباطی در مطالعه حاضر از چند منظر قابل توجه است. اول آنکه ممکن است استعداد فرد با جهش ژن یادشده افزایش یابد، اما چون تعداد نمونه این مطالعه کم بود، ما نتوانستیم این رابطه را نشان دهیم. آومویا^{۱۳} و همکاران نیز با بررسی پلی‌مورفیسم ژن IFN- γ R1 بر روی ۲۴۰ فرد مسلول و تعداد برابر در گروه شاهد، نتوانستند این رابطه را نشان دهند. دوم آنکه ممکن است پلی‌مورفیسم‌های دیگری در ساختار ژن IFN- γ R1 با استعداد ابتلا به سل ربوی مرتبط باشند که در این مطالعه ارزیابی نشده‌اند. در دو مطالعه آومویا و فراسر^{۱۴} و همکارانشان، دست کم ۱۰ بخش مختلف ژن IFN- γ R1 بررسی شده است، اما ارتباط آماری معنی‌داری در هیچ مورد یافت نشد. مطالعه فعلی بر این پایه انجام شد که در دو مطالعه یادشده، منطقه ۳۹۵ این ژن که ارتباط جهش در آن با استعداد ابتلا به سل ربوی بیشتر نشان داده شده بود، به‌طور جداگانه بررسی نشده بود. به عبارت دیگر، در جمع سه مطالعه، بخش‌های متعدد

References

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of Tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO global surveillance and monitoring project. JAMA 1999;282:677-86.
2. Schluger NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. Respir Res 2001;2:157-63.
3. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria. The human model. Annu Rev Immunol 13. Awomoyi 14. Fraser 15. Bellamy

2002;20:581-620.

4. Gómez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Mola EM, Montero MD. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multi center active-surveillance report. Arthritis Rheum 2003;48:2122-7.
5. Levy MH, Connelly Ma, O'brien RJ. Cigarette smoking as a risk for tuberculosis in young adults: a case – control study. Tuber Lung Dis 1996;77:570.
6. Beck JS, Lowe JG, Grange JM. Corticosteroid as a risk factor for tuberculosis. Tuber Lung Dis 1993;74:413-4.

7. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma- receptor deficiency in an infant with fatal bacilli calmette- Guerin infection. *N Eng J Med* 1996;335:1956-9.
8. Altare F, Lammas D, Revy P, Jouanguy E, Döffinger R, Lamhamedi S. Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacilli calmette-Guerin and salmonella enteritidis disseminated infection. *J Clin Invest* 1998;102: 2035- 40.
9. de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ, et al. Severe mycobacterial and salmonella infections in interleukin – 12 receptor deficient patients. *Science* 1998;280:1435-8.
10. Döffinger R, Jouanguy E, Dupuis S, Fondanèche MC, Stephan JL, Emile JF, et al. Partial Interferon-gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with bacilli calmette-Guerin and mycobacterium abcessas infection. *J Infection Dis* 2000;181:379-84.
11. Gollob JA, Veenstra KG, Jyonouchi H, Kelly AM, Ferrieri P, Panka DJ, et al. Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections. *J Immunol* 2000;165:4120-6.
12. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondanèche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, et al. Partial interferon γ receptor 2 deficiency in a child with tuberculosis bacillus Calmette Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 1997;100:2658-64.
13. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon γ receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Eng J Med* 1996;336:1941-49.
14. Soh J, Donnelly RJ, Kolenko S, Mariano TM, Cook JR, Wang N, et al. Identification and sequence of and accessory factor required for activation of interferon γ receptor. *Cell* 1994;76:793-802.
15. Lewis DB, Wilson CB. Gamma- interferon: an immunoregulatory lymphokine with immunotherapeutic potential. *Pediatr Infect Dis* 1990;9:642-51.
16. Awomoyi AA, Nejentsev S, Richardson A. No association between interferon γ receptor gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. *Thorax* 2004;59:291-4.
17. Fraser DA, Bulat-Kardum L, Knezevic J. Interferon δ receptor-1 Gene polymorphism in tuberculosis patient from Croatia. *Scand J Immunol* 2003;57:480-4.
18. Miandehi N, Shekarabi M, Mansoori Sd. The study of Th1 and Th2 cytokines profile (IFN – γ IL -10) in PBMCs of patients with MDR–TB and newly diagnosed treated cases tuberculosis. 7th Iranian Congress of immunology and allergy, mashhad. *Iranian Journal of Immunology* 2004;76 [abstract].
19. Nikokar L, Makvandi M, Mirsaeidi SM. The study of cell proliferation and gamma interferon production against purified antigen 85 in patients with tuberculosis and healthy subjects. 7th Iranian Congress of immunology and allergy, mashhad. *Iranian Journal of Immunology* 2004;77 [abstract].
20. Rossouw M, Nel H, Cooks G, Van Helden P, Hoal E. Association between tuberculosis and a polymorphic Nf - KB binding site in the interferon γ gene. *Lancet* 2003; 361: 1871-2.
21. López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, et al. Interferon gamma and interlukin 10 gene polymorphism in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Med* 2003;167:970-5.
22. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome- wide sacn. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97: 8005-9.
23. Mohammadi j. A 15-year survey on BCGiosis cases in Massih Daneshvari hospital and pediatric medical center in Tehran [Dissertation]. Tehran Shahees Beheshti Medical Science University; 2004.