

متیلاسیون ژن اینترفرون گاما در بیماران مواجهه یافته با سولفورموستارد

نویسندگان: اشرف وفا^۱، سقراط فقیهزاده^۲، سارا غفارپور^۳، حسین بهبودی^۴، محمد صابر زمانی^۵، طوبی غضنفری^{۱*}

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی شاهد، تهران، ایران
۲. گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
۳. مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴. گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۵. گروه تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

E-mail: tghazanfari@yahoo.com

* نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

چکیده

مقدمه و هدف: اینترفرون گاما یکی از سایتوکین های مهم در بروز بیماری های التهابی مزمن ریوی مانند آسم و COPD است. متیلاسیون نواحی CPG پرموتوری این ژن می تواند تحت تاثیر موادشیمیایی و سمی مختلف دچار تغییر شود که این تغییرات در بروز بیماری های مزمن ریوی و شدت آن نقش دارد. در این مطالعه به بررسی اثر ماده شیمیایی سولفورموستارد بر وضعیت متیلاسیون پرموتر ژن اینترفرون گاما و ارتباط آن با شدت بیماری ریوی در جانبازان شیمیایی با مشکلات تاخیری ریوی پرداخته شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ۴۶ فرد مواجهه یافته با علائم خفیف تا متوسط ریوی، ۴۵ فرد مواجهه یافته با علائم شدید ریوی و ۴۱ فرد مواجهه نیافته به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. کیفیت و کمیت DNA های استخراج شده از خون این افراد مورد بررسی قرار گرفته و نمونه های مناسب پس از تیمار با بی سولفیت از نظر وضعیت متیلاسیون پرموتر ژن IFN- γ از طریق تست MSP مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: سطح متیلاسیون پرموتور ژن IFN- γ در گروه مواجهه یافته با مشکلات خفیف تا متوسط افزایش معناداری و در گروه مواجهه یافته با مشکلات شدید کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت. سطح فاکتورهای اسپیرومتري در افراد دارای DNA متیله بیش از افراد دارای DNA غیر متیله بود.

نتیجه گیری: با توجه به یافته های به دست آمده می توان پیشنهاد داد که افزایش متیلاسیون نواحی پرموتوری و احتمالاً تغییر بیان ژن IFN- γ در مواجهه یافتگان با گاز خردل می تواند تاثیر مثبتی بر روی عملکرد ریه داشته باشد.

واژگان کلیدی: اینترفرون گاما، سولفورموستارد، متیلاسیون، مشکلات ریوی

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و هفتم - شماره ۱۴۴
دی ۱۳۹۸

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۶
آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۸/۰۹/۲۰
پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۱

مقدمه

موش که در مواجهه با سولفورمستارد قرار گرفته بودند، تغییرات اپی ژنتیک به ویژه اختلال در متیلاسیون را نشان داده است (۱۹). مطالعه و طبقه بندی این تغییرات پس از تماس با SM می تواند مکانیسم آن را آشکار کرده و یک استراتژی مناسب برای درمان بیماران مواجهه یافته با SM باشد (۲۰).

در تماس با مواد شیمیایی افزایش آشکاری در متیلاسیون جزایر CPG ژن IFN- γ دیده شده که موجب کاهش بیان این ژن شده است (۲۱-۲۲). به عنوان مثال در بررسی اثر ایزوسیونات بر روی متیلاسیون ژن IFN- γ در بیماران مبتلا به آسم شغلی، در ۳ گروه مواجهه یافته با علائم اختصاصی، مواجهه یافته با علائم خفیف و مواجهه یافته فاقد علائم، افزایش قابل توجهی در متیلاسیون پروموتور این ژن در گروه اول مشاهده شده است (۲۱). این مطالعه نشان می دهد که الگوی متیلاسیون این ژن می تواند در شدت های مختلف مشکلات ریوی متفاوت باشد.

با توجه به تاثیر پذیری پروموتور ژن IFN- γ نسبت به مواد شیمیایی و تغییر الگوی متیلاسیون این توالی در بیماران COPD، آسم و IPF، این مطالعه با هدف مقایسه سطح متیلاسیون ژن IFN- γ در جانبازان شیمیایی با شدت های مختلف مشکلات ریوی و افراد سالم و همچنین ارتباط بین متیلاسیون این ژن و شدت مشکلات ریوی در مواجهه یافتگان انجام شد.

مواد و روش ها

جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه دو گروه از جانبازان شیمیایی شامل ۴۵ نفر دارای مشکلات ریوی شدید و ۴۶ نفر دارای مشکلات ریوی خفیف تا متوسط از بین جانبازان شیمیایی دارای پرونده تایید شده توسط کمیسیون پزشکی جانبازان انتخاب گردیدند. همچنین ۴۱ نفر از افراد سالم غیر شیمیایی به عنوان گروه شاهد وارد مطالعه گردیدند. معیار ورود به مطالعه در همه شرکت کنندگان، رنج سنی ۶۵-۳۵ سال و توزیع یکسان سن، توزیع

گاز مستارد یا سولفورمستارد^۱ (SM) یک ماده ی کشنده و سمی است (۱) که در جنگ جهانی اول و جنگ عراق علیه ایران (۳۸۷ بار در سال های ۱۹۸۸-۱۹۸۰) استفاده شده است (۲). اگرچه مرگ و میر ناشی از SM پایین است ولی دارای اثرات شدید بسیاری از جمله عوارض حاد و مزمن تنفسی، چشمی، پوستی، فیزیولوژیک، هماتولوژیک، ایمونولوژیک، گوارشی و اندوکراین است که در نهایت کیفیت زندگی قربانیان را تحت تاثیر قرار می دهد (۳). بیشترین عوارض بالینی ناشی از SM در ایران مشکلات ریوی است (۴) که مهم ترین آن ها شامل برونشیت مزمن، برونشولیت (۵،۶)، آسم (۵)، بیماری انسدادی مزمن ریوی (COPD) (۷،۸)، آمفییزم، فیروز ریوی (IPF) (۵،۹)، برونشولیت آلبیترانس (BO) (۱۰) و در مواجهه طولانی مدت سرطان ریه است (۴).

اینترفرون گاما (IFN- γ) سایتوکینی است با فعالیت ضد فیروز که موجب مهار تولید کلاژن توسط فیروبلاست ها می شود (۱۱) و تجویز آن در مدل موشی موجب کاهش فیروز می شود (۱۲). کاهش میزان IFN- γ در بیماری های ریوی مزمن می تواند در تجمع کلاژن نقش داشته باشد (۱۳). از طرفی افزایش این سایتوکین موجب التهاب از نوع پاسخ ایمنی سلولی (افزایش TH1، CTL) و تولید سیتوکین های التهابی و تخریب بافت ریه می شود (۱۴).

در سال های اخیر مطالعات زیادی در زمینه اپی ژنتیک بخصوص متیلاسیون DNA و ارتباط آن با التهاب (۱۵)، بیان ژن در بیماری های ریوی (۱۶) و بیان سایتوکاین های التهابی (۱۷) انجام شده است. در مقایسه متیلاسیون DNA در سلول های اپیتلیال آلوئولار در بیماران IPF و COPD، در بیماران IPF بیشتر هیپومتیلاسیون جزایر CPG مشاهده شده در حالی که در بیماران COPD بیشتر هیپومتیلاسیون مشاهده گردیده است (۱۸). مطالعات بر روی DNA سلول های اندوتلیال

^۱. Sulfur mustard

میکروگرم DNA بافر بی سولفیت میکس اضافه گردید و نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (بایورد، ایالات متحده) انکوبه گردید. سپس فرآیند خالص‌سازی بر روی نمونه‌ها انجام گرفت و با استفاده از ستون و بافرهای شستشو ۴۰ میکرولیتر DNA بی سولفیت شده تخلیص شد.

انجام Methylation Specific PCR

از پرایمرهای طراحی شده در مقاله‌ی یانگ و همکاران (۲۳) برای جزیره CpG پروموتور ژن IFN- γ استفاده شد که در جدول ۱ آورده شده است. علت انتخاب این نواحی در پروموتور به‌عنوان توالی هدف، مهم بودن این نواحی در مطالعات انجام گرفته در زمینه‌ی متیلاسیون و قرار گرفتن این مناطق در جزایر CpG پروموتور بوده است. البته برای اطمینان کامل، پرایمرها با توالی ناحیه هدف مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای انجام تست PCR از مسترمیکس TEMPase Hot Start 2x Master mix A (امپلیکون، دانمارک) استفاده شد. برنامه دمایی و زمانی تست PCR شامل یک انکوباسیون ۱۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه، اتصال پرایمرها به DNA هدف (۶۹ درجه برای پرایمر متیله و ۷۰ درجه برای پرایمر غیر متیله) به مدت ۳۰ ثانیه و طولی سازی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، و طولی سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR به ژل آگارز ۲ درصد انتقال یافت و نتایج کار توسط دستگاه ژل داک رویت شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری به وسیله نرم افزار SPSS ورژن ۱۶ انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین (SEM) نشان داده شد. تفاوت متغیرها با تستهای آماری مناسب شامل ANOVA، Student-t، Kruskal-Wallis و Mann-Whitney U بررسی شد. P-value کم تر از ۰.۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یکسان از نظر فاکتورهای محیطی، شغل، سیگار، بیماری‌های زمینه‌ای و رضایت فرد برای مشارکت در مطالعه و تکمیل فرم رضایت می‌باشد. این مطالعه با به تایید کمیته اخلاق دانشگاه شاهد رسیده و کد اخلاق IR.SHAHED.REC.1397.009 را اخذ نموده است.

بررسی بالینی و گروه‌بندی افراد

پزشک عمومی یا متخصص داخلی وضعیت افراد گروه کنترل را بررسی کرده و سلامت افراد را از نظر نداشتن مشکلات ریوی تایید نمود. برای گروه مورد نیز ابتدا عدم وجود عفونت حاد طبق نظر پزشک متخصص بررسی شد؛ سپس بیماران از نظر وضعیت بالینی ریه و شدت ضایعات ریوی دسته‌بندی شدند. گروه‌بندی آسیب‌های ریوی از نظر شدت، براساس پروتکل کمسیون پزشکی جانبازان در ۲ گروه خفیف تا متوسط و شدید صورت گرفت.

استخراج DNA از نمونه خون و تهیه نمونه کاملاً متیله و غیر متیله

DNA ژنومی از یک میلی لیتر خون حاوی ضد انعقاد EDTA با استفاده از محلول DNG (سینا کلون، ایران) استخراج شد. برای سنجش کیفی و کمی DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (ترموساینتیفیک، ایالات متحده) استفاده شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب در A260/A280 و نسبت جذب A260/A230 آنها بین ۱.۸ تا ۲ بود به عنوان نمونه‌های مناسب انتخاب شدند.

جهت تهیه نمونه کاملاً متیله از آنزیم CpG Methyltransferase (M.SssI) و نمونه کاملاً غیر متیله از آنزیم Phi29 به روش تکثیر کامل ژنوم (هر دو ساخته شرکت Thermo Scientific، لیتوانی) استفاده شد. کار مطابق پروتوکول پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد.

تیمار DNA استخراج شده با بی سولفیت^۱

برای تیمار DNA با بی سولفیت از کیت EpiTect Bisulfite kit (کایاژن، آلمان) استفاده شد. تیمار نمونه‌ها مطابق دستورالعمل موجود در کیت، انجام شد. به ۲

^۱. Bisulfite Treatment

جدول ۱. توالی پرایمرهای IFN- γ و بیزه MSP

توالی	پرایمر
5'-TTAGTATTTTGGGAGGTTAAGGC-3'	F-IFN- γ M
5'-CGAATAACTAAAACACTACAAACACTCG-3'	R-IFN- γ M
5'-TAGTATTTTGGGAGGTTAAGGTGG-3'	F-IFN- γ U
5'-CCAAATAACTAAAACACTACAAACACTCAC-3'	R-IFN- γ U

F: Forward, R: Reverse, M: Methylated, U: Unmethylated.

نتایج

افزایش معنی‌دار در شیوع متیلاسیون ژن IFN- γ در گروه خفیف تا متوسط به نسبت گروه کنترل و کاهش معناداری در شیوع متیلاسیون در گروه شدید به نسبت گروه کنترل و خفیف تا متوسط دیده شد. از نظر درصد متیلاسیون بین گروه کنترل و تمام افراد مواجهه یافته اختلاف معناداری دیده نمی‌شود (جدول ۲).

در این مطالعه از DNA استخراج شده از ۴۶ فرد مواجهه یافته با علائم خفیف تا متوسط ریوی، ۴۵ فرد مواجهه یافته با علائم شدید ریوی و تعداد ۴۱ فرد مواجهه نیافته استفاده شد. میانگین سنی افراد گروه کنترل، ۴۱.۷۱ سال و میانگین سنی افراد گروه مواجهه یافته ۴۷.۶۶ سال بود.

جدول ۲. تعداد افراد گروه مواجهه یافته و گروه کنترل براساس طبقه بندی بنیاد و درصد متیله و غیر متیله

گروه	کنترل	متیلاسیون				P-value	
		تعداد	غیر متیله		متیله		
			تعداد	درصد	تعداد		درصد
گروه	کنترل	۴۱	۸	٪۱۹.۵	۳۳	٪۸۰.۵	۰.۱۴۴
	مواجهه یافته	۹۱	۲۹	٪۳۱.۹	۶۲	٪۶۸.۱	
طبقه مشکلات ریوی	کنترل	۴۱	۸	٪۱۹.۵	۳۳	٪۸۰.۵	۰.۰۱۱
	خفیف تا متوسط	۴۶	۱	٪۲.۲	۴۵	٪۹۷.۸	
	شدید	۴۵	۲۸	٪۶۲.۲	۱۷	٪۳۷.۸	

میانگین سنی افراد دارای DNA متیله و غیر متیله در هر دو گروه کنترل و مواجهه یافته اختلاف معناداری نشان نداد. از نظر فاکتورهای اسپیرومتري که در افراد مواجهه یافته انجام گرفت نیز کاهش معناداری در درصد FVC و FEV1 و FEV1/FVC در افراد غیر متیله دیده شد (جدول ۳).

میانگین سنی افراد دارای DNA متیله و غیر متیله در هر دو گروه کنترل و مواجهه یافته اختلاف معناداری نشان نداد. از نظر فاکتورهای اسپیرومتري که در افراد مواجهه یافته انجام گرفت نیز کاهش معناداری در درصد FVC و FEV1 و FEV1/FVC در افراد غیر متیله دیده شد (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه بین گروه مواجهه یافته و کنترل از نظر سن و فاکتورهای اسپیرومتری در دو گروه متیله و غیر متیله

		متیلاسیون									P-value
		کل			غیر متیله			متیله			
		تعداد	میانگین	انحراف معیار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	
سن	کنترل	۴۱	۴۱.۷۱	۹.۷۸	۸	۴۵.۱۳	۶.۲۰	۳۳	۴۰.۸۸	۱۰.۳۶	۰.۱۵۲
	مواجهه یافته	۹۱	۴۷.۶۶	۸.۲۵	۲۹	۴۶.۱۰	۷.۷۸	۶۲	۴۸.۳۹	۸.۴۲	۰.۲۲۱
FVC (%)	مواجهه یافته	۸۷	۵۹.۸۴	۱۵.۳۸	۲۹	۴۵.۳۳	۱۲.۳۰	۵۸	۶۷.۱۰	۱۱.۰۴	۰.۰۰۱>
FEV1 (%)	مواجهه یافته	۸۷	۴۷.۶۴	۱۹.۴۸	۲۹	۳۰.۰۸	۱۵.۱۹	۵۸	۵۶.۴۲	۱۴.۹۶	۰.۰۰۱>
FEV1/FVC	مواجهه یافته	۸۶	۵۸.۶۷	۱۸.۰۲	۲۸	۴۸.۱۴	۱۵.۵۹	۵۸	۶۳.۷۶	۱۶.۹۹	۰.۰۰۱>
FEV1/FVC (%)	مواجهه یافته	۸۷	۷۴.۰۹	۲۰.۳۳	۲۹	۶۱.۲۵	۱۲.۰۴	۵۸	۸۰.۵۱	۲۰.۶۵	۰.۰۰۱>

FVC: forced vital capacity; FEV1: had first second of forced expiration

حالی که در مبتلایان به برونشیت مزمن میانگین سنی افراد دارای DNA متیله به نسبت افراد دارای DNA غیر متیله افزایش معنی داری را نشان داد. در همه‌ی گروه‌ها (برونشیت مزمن، برونشیت مزمن و آسم) فاکتورهای اسپیرومتری در گروه غیر متیله به صورت معنی داری پایینتر از گروه متیله بود (جدول ۴).

بر اساس نوع بیماری مواجهه یافتگان به ۳ گروه افراد مبتلا به برونشیت مزمن، برونشیت مزمن و آسم تقسیم بندی شدند. بیشترین تشخیص در بیماران به ترتیب برونشیت مزمن، برونشیت مزمن و آسم بود. در میان افراد مبتلا به برونشیت مزمن و آسم تفاوت معنی داری بین سن گروه متیله و غیر متیله دیده نشد. در

جدول ۴. مقایسه وضعیت متیلاسیون بین افراد مواجهه یافته بر اساس نوع بیماری

		متیلاسیون									P-value
		کل			غیر متیله			متیله			
		تعداد	میانگین	انحراف معیار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	
سن	برونشیت مزمن	۳۵	۴۷.۵۱	۸.۸۸	۱۳	۴۸.۹۲	۹.۷۱	۲۲	۴۶.۶۸	۸.۴۷	۰.۴۷۹
	برونشیت مزمن	۴۱	۴۶.۹۳	۷.۱۰	۱۲	۴۲.۷۵	۴.۳۳	۲۹	۴۸.۶۶	۷.۳۵	۰.۰۱۳
	آسم	۸	۵۱.۳۸	۹.۱۸	۳	۴۸.۶۷	۶.۵۱	۵	۵۳.۰۰	۱۰.۸۴	۰.۵۶۰
FVC (%)	برونشیت مزمن	۳۵	۵۳.۳۸	۱۳.۶۷	۱۳	۴۷.۸۲	۱۲.۸۵	۲	۶۴.۶۲	۹.۹۲	۰.۰۰۱>
	برونشیت مزمن	۴۰	۶۰.۷۸	۱۶.۵۳	۱۲	۴۴.۲۵	۱۳.۲۱	۲۸	۶۷.۸۶	۱۲.۲۶	۰.۰۰۱>
	آسم	۸	۵۸.۷۵	۱۶.۴۳	۳	۴۲.۰۰	۷.۸۱	۵	۶۸.۸۰	۱۰.۲۶	۰.۰۰۸
FEV1 (%)	برونشیت مزمن	۳۵	۴۲.۷۵	۱۸.۳۲	۱۳	۲۷.۴۸	۷.۱۲	۲۲	۵۳.۳۷	۱۵.۹۳	۰.۰۰۱>
	برونشیت مزمن	۴۰	۴۸.۷۶	۱۸.۲۱	۱۲	۳۵.۵۸	۲۱.۰۲۹	۲۸	۵۴.۴۱	۱۳.۵۶	۰.۰۰۲
	آسم	۸	۵۲.۵۰	۲۵.۰۹	۳	۲۳.۳۳	۸.۱۴	۵	۷۰.۰۰	۶.۸۹	۰.۰۰۱>
FEV1/FVC (Measured)	برونشیت مزمن	۳۵	۵۶.۳۳	۱۴.۸۸	۱۳	۴۵.۵۸	۴.۵۲	۲۲	۶۰.۶۸	۱۵.۲۶	۰.۰۰۸
	برونشیت مزمن	۳۹	۶۰.۷۱	۱۷.۹۳	۱۱	۵۷.۰۰	۱۶.۹۲	۲۸	۶۲.۱۷	۱۸.۴۰	۰.۰۱۵
	آسم	۸	۵۷.۸۸	۱۹.۱۷	۱	۴۲.۶۷	۸.۳۹	۵	۶۷.۰۰	۱۸.۱۸	۰.۰۱۵
FEV1/FVC (%)	برونشیت مزمن	۳۵	۶۸.۴۳	۱۸.۲۰	۱۳	۵۸.۰۹	۶.۶۳	۲۲	۷۴.۵۴	۲۰.۱۵	۰.۰۰۱>
	برونشیت مزمن	۴۰	۷۶.۳۹	۱۹.۵۰	۱۲	۶۵.۱۷	۱۶.۸۰	۲۸	۸۱.۲۰	۱۸.۸۲	۰.۴۲۵
	آسم	۸	۸۵.۳۸	۲۳.۵۴	۳	۶۲.۳۳	۳.۲۱	۵	۹۹.۲۰	۱۸.۱۰	۰.۰۴۳

بحث

گروه کنترل انجام شد، آنالیز نتایج، افزایش تعداد لنفوسیت Th1 در مقایسه با افراد کنترل را نشان داده است. این لنفوسیت‌ها IFN- γ بیشتری ترشح کرده و CXCR3 بیشتری را بیان می‌کردند. این مطالعه ارتباط قوی بین افزایش TH1 و تخریب بافت ریه مرتبط با IFN- γ و MIG و IP10 را نشان داده است (۲۷).

مطالعات بسیاری اثر مواد شیمیایی را بر روی متیلاسیون نواحی پروموتوری ژن اینترفرون گاما در گروه‌های مختلف میتلا به آسم بررسی کردند و افزایش معنادار در سطوح متیلاسیون ژن IFN- γ در گروه بیمار به ویژه افراد با عوارض شدید را گزارش کردند. در برخی از این مطالعات هایپرمتیلاسیون این ژن به‌عنوان یک بیومارکر برای شناسایی آسم معرفی شده است (۲۱، ۲۸، ۲۹، ۳۲).

با در نظر گرفتن مطالب فوق، احتمالاً الگوی بیان و متیلاسیون ژن IFN- γ در بین بیماران برونشیت اَبلیترانس و COPD با آسم متفاوت است. نتایج کار حاضر نیز نشان می‌دهد که احتمالاً الگوی متیلاسیون ژن IFN- γ در جانبازان شیمیایی با عوارض شدید ریوی مشابه بیمارانی با تشخیص برونشیت اَبلیترانس و COPD می‌باشد.

اهمیت مطالعه حاضر از آن جهت است که هیپومتیلاسیون ژن IFN- γ و احتمالاً افزایش بیان آن یکی از دلایل واکنش‌های التهابی و شدت بیماری ریوی مواجهه یافتگان باشد و در صورت تایید نتایج با روش‌های کمی مانند بی‌سولفیت سکونسینگ و HRM و همچنین بررسی بیان ژن IFN- γ با روش کمی RT-PCR و ارتباط آن با سطوح متیلاسیون این ژن، از طرفی می‌تواند در انتخاب روند درمانی بیماران موثر باشد.

نتیجه‌گیری

در نتیجه احتمالاً می‌توان اینگونه تخمین زد که افزایش متیلاسیون پروموتور این ژن می‌تواند تغییراتی در بیان آن اعمال کند که به روند عملکرد ریه در این بیماران کمک می‌کند.

تغییرات اپی‌ژنتیک متعددی در بیماری‌های التهابی ریه مانند COPD، آسم، IPF و حتی در مدل‌های حیوانی مواجهه یافته با سولفورموستارد نشان داده شده است که موجب فعال شدن مسیرهای مولکولی پیچیده التهابی مانند مسیر^۱ NFkB و Jack-Stat می‌شوند (۲۴). متیلاسیون DNA یکی از مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک است که عمدتاً در خاموش کردن ژن دخالت داشته و نقش کلیدی در حفظ تمایز سلولی ایفا می‌کند (۲۵).

در مطالعه حاضر افزایش وقوع متیلاسیون در افراد مواجهه یافته با عوارض خفیف تا متوسط و کاهش آن در افراد مواجهه یافته با عوارض شدید به نسبت گروه کنترل مشاهده شد. همچنین با مقایسه سطح فاکتورهای اسپرومتری که نشان دهنده عملکرد ریه می‌باشند، رابطه مستقیم بین افزایش سطح فاکتورهای اسپرومتری و میزان وقوع متیلاسیون دیده شد.

اینترفرون گاما یک سایتوکاین پیش التهابی است که در ایمونوپاتوژنز بیماری‌های التهابی مزمن ریوی از جمله COPD و آسم نقش داشته و موجب التهاب از نوع پاسخ ایمنی سلولی (افزایش TH1، CTL) و تولید سایتوکین‌های التهابی و تخریب بافت ریه می‌شود (۱۴). افزایش ترشح IFN- γ در بیماران برونشیت اَبلیترانس موجب افزایش تعداد و عملکرد ماکروفاژها و ترشح سایتوکین‌های پیش التهابی (IL1، IL6، TNF- α) و به دنبال آن تخریب آنزیم‌ها و تولید واسطه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۲۶).

در بیماران مبتلا به COPD، التهاب با الگوی سایتوکین‌های مترشح‌ه از لنفوسیت‌های T مرتبط است و تعداد لنفوسیت‌های ترشح‌کننده IFN- γ در ریه بیماران مبتلا به COPD افزایش می‌یابد. همچنین سطوح ژن IFN- γ در مسیرهای هوایی و سیگنالینگ آن در ریه این بیماران افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که به منظور تعیین فنوتیپ لنفوسیت‌های T Helper در نمونه‌های ریه افراد سیگاری مبتلا به COPD متوسط تا شدید و آمفیژم و

^۱. Nuclear factor-kappa B

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی

دانشگاه شاهد سپاس‌گزار هستند.

منابع

- Balali M, Hefazi M. The pharmacology, toxicology and medical treatment of sulfur mustard poisoning. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2005;19:297-315
- Balali-Mood M, Balali-Mood K, Danei G, Ghaeninejad E. Organophosphorous nerve agents poisoning. *Journal of Birjand University of Medical Sciences* 2006;13:5-24
- Mansour Razavi S, Salamati P, Saghafinia M, Abdollahi M. A review on delayed toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012 Oct 9;20(1):51
- Dadpey M, Ghahari L. Respiratory complication of mustard gas in Iraq-Iran war victims living in Kermanshah. *Journal of Army University of Medical Sciences of the I.R. Iran* 2007;5:1331-1335.
- Ghasemi Broumand M, Karamy G, Pourfarzam S, Emadi SN, Ghasemi H. Late concurrent ophthalmic, respiratory, cutaneous and psychiatric complications of chemical weapons exposure in 479 war patients. *Daneshvar Medicine* 2007;70:81-92
- Bagheri MH, Hosseini SK, Mostafavi SH, Alavi SA. High-resolution CT in chronic pulmonary changes after mustard gas exposure. *Acta Radiologica* 2003;44:241-245
- Ghanei M, Amiri S, Akbari H, Kosari F, HosseiniKhalili AR, Alaeddini F, Aslani J, Giardina C, Haines DD. Correlation of sulfur mustard exposure and tobacco use with expression (immune reactivity) of p53 protein in bronchial epithelium of Iranian mustard lung patints. *MilMed Journal* 2007;172:70-74.
- Einollahi B, Jadidi K. A study of ophthalmic complications due the Mustard gas in the chemical war injured. *Kowsar Medical Journal* 2000;4:285-287.
- Ghanei M, Harandi AA. Long term consequences from exposure to sulfur mustardreview. *Inhalation Toxicology* 2007;19:451-456
- Alavian SM, Fallahian F, Shohrati M, Fakher-Yaseri H, Zamani F. Long term effects of mustard gas on Iranian veterans. *Shiraz E-Medical Journal* 2009;10:1-10.
- Rosenbloom J, Feldman G, Freundlich B, Jimenez SA. Transcriptional control of human diploid fibroblast collagen synthesis by γ -interferon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 123: 365-372.
- Hyde DM, Henderson TS, Giri SN, et al. Effect of murine-gamma interferon on the cellular responses to bleomycin in mice. *Experimental Lung Research* 1988; 14: 686-704.
- Prior C, Haslam P. In vivo levels and in vitro production of interferon gamma in fibrosing interstitial lung diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 1992; 88: 280-287
- Rybka J, Korte SM, Czajkowska-Malinowska M, Wiese M, Kędziora-Kornatowska K, Kędziora J. The links between chronic obstructive pulmonary disease and comorbid depressive symptoms: role of IL-2 and IFN- γ . *Clinical and Experimental Medicine* 2016;16(4):493-502.
- Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *Journal of Dental Research* 2011;90(1):9-17.
- Yang IV, Schwartz DA. Epigenetic control of gene expression in the lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2011;183(10):1295-301.
- Yasmin R, Siraj S, Hassan A, Khan AR, Abbasi R, Ahmad N. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. *Mediators of Inflammation* 2015.
- Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2014 15;189(10):1161-72.
- Steinritz D, Schmidt A, Balszuweit F, Thiermann H, Simons T, Striepling E, et al. Epigenetic modulation in early endothelial cells and DNA hyper methylation in human skin after sulfur mustard exposure. *Toxicology Letters* 2016;244:95-102.
- Imani S, Panahi Y, Salimian J, Fu J, Ghanei M. Epigenetic: A missing paradigm in cellular and molecular pathways of sulfur mustard lung: a prospective and comparative study. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2015;18(8):723.
- Ouyang B, David I, Zana L. Interferon- γ promoter is hypermethylated in blood DNA from workers with confirmed Diisocyanateasmthma. *Toxicological Sciences* 2013; 133(2): 218-224.
- Kohli A. Secondhand smoke in combination with ambient air pollution exposure is

- associated with increased CpG methylation and decreased expression of IFN- γ in T effector cells and Foxp3 in T regulatory cells in children. *Clinical Epigenetics* 2012;4:17.
23. Ouyang B, Baxter CS, Lam H-M, Yeramanehi S, Levin L, Haynes E, et al. Hypomethylation of dual specificity phosphatase 22 promoter correlates with duration of service in firefighters and is inducible by low-dose benzo[a]pyrene. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 2012;54(7):774.
 24. Imani S, Panahi Y, Salimian J, Fu J, Ghanei M. Epigenetic: A missing paradigm in cellular and molecular pathways of sulfur mustard lung: a prospective and comparative study. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2015;18(8):723.
 25. Durham AL, Adcock IM. Basic science: Epigenetic programming and the respiratory system. *Breathe* 2013;9(4):278-88.
 26. Lu KC, Jaramillo A, Lecha RL, Schuessler RB, Aloush A, Trulock EP, Mendeloff EN, Huddleston CB, Patterson GA, Mohanakumar T. Interleukin-6 and interferon- γ gene polymorphisms in the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* 2002;74(9):1297-302.
 27. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Medicine* 2004;1(1):e8
 28. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002 295(5557):1079-8210.
 29. Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286(21):18347-53.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
27th Year, No.144
December 2019-
January 2020*

Received: 28/09/2019

Last revised: 11/12/2019

Accepted: 22/12/2019

Methylation of IFN- γ in sulfur mustard-exposed patients

Ashraf Vafa^{1,2}, Soghrat Faghihzadeh², Sarah Ghafarpour³, Hossein Behboodi⁴, Mohammad Saber Zamani⁵, Tooba Ghazanfari^{1,3}

1. Department of Immunology, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Department of Biostatistics and Social Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Islamic Republic of Iran.
3. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
4. Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Islamic Republic of Iran
5. Department of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Corresponding author e-mail: tghazanfari@yahoo.com.

Abstract

Introduction: IFN- γ is one of the most important cytokines in the development of chronic inflammatory diseases such as asthma and COPD. The IFN- γ promoter methylation at CpG islands could be altered by various chemical and toxic substances which may have a role in the incidence of chronic pulmonary diseases and its severity. Thereby, the present study was aimed to evaluate the effect of sulfur mustard gas on the methylation status of IFN- γ gene promoter and its correlation with the severity of pulmonary disease in chemical veterans with delayed pulmonary complications.

Methods: 46 sulfur mustard-exposed individuals with mild-moderate pulmonary complications, 45 with severe pulmonary complications and 41 unexposed individuals as a control group participated. The quality and quantity of extracted DNA were assessed by the nanodrop machine. After treatment with bisulfite, the methylation of IFN- γ gene promoter was evaluated by methylation-specific PCR.

Results: The methylation of IFN- γ gene promoter showed a significant increase in exposed-patients with mild to moderate pulmonary complications and a significant reduction in exposed-patients with severe pulmonary complications compared to the control groups. The levels of spirometric parameters were significantly higher in individuals with Methylated DNA compared with those with unmethylated DNA.

Conclusion: It could be suggested that hyper-methylation of IFN- γ gene promoter and probable changes in IFN- γ gene expression have a positive effect on lung function in SM-exposed individuals.

Keywords: Methylation, IFN- γ , Sulfur mustard, Pulmonary complications