Research on Medicine

Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Vol.39; No.2; 2015

Relation of multiple sclerosis and interferon-beta consumptionwith expression of thioredoxin Trx 1

Elham Mahmoudian[1], Ahad Khalilnezhad[2], Fatemeh Mahmoodi[1], Kurosh Gharagozli[3], Davar Amani[2]*

1. Department of Cellular & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Neurology, Loghman Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2015/2/24 Accept: 2015/11/28)

Abstract

Background: *Regarding the increasing incidence of multiple sclerosis (MS), importance of biomarkers, and also the probable changes in expression of Trx1 gene in this disease, herein we investigated mRNA expression level of Trx1 gene in peripheral blood leukocytes of patients with MS, receiving no medications and those receiving interferon beta, relative to healthy individuals.*

Methods: *Six healthy subjects, as control, and 12 patients with multiple sclerosis, divided into two groups of patients without medications (n=6) and interferon-beta receiving patients (n=6), were included in the study. The numbers of Trx1 mRNA transcripts in two groups of the patients was measured by SYBR green real-time PCR technique, and compared relative to those of healthy individuals.*

Results: *The mRNA expression of Trx1 in patients without medications was about 1.98 folds higher relative to the healthy controls. However, this difference was not statistically significant ($p > 0.05$). Also, the mRNA expression of Trx1 in interferon-beta receiving patients exhibited an insignificant increase ($p > 0.05$) relative to that of healthy controls and patients without medications (3.28 and 1.66 folds, respectively).*

Conclusion: *According to our results, the expression of Trx1 gene seems to be a suitable index for MS especially in the patients receiving interferon beta. However, more remains to be elucidated in support of this hypothesis through large-sample size studies. Also, the possible effect of other medications followed by MS patients including immunosuppressive drugs is suggested to receive attention in future investigations.*

Keywords: *Anti-oxidants., Multiple sclerosis, Oxidants, Redox system, Thioredoxin*

Archive of SID

• *Corresponding authors: Davar Amani, Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran 1985717443, Iran.*
E-mail: amanid@sbmu.ac.ir
Tel/Fax:+ 98 21 22439970

www.SID.ir

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور۳۹، شماره ۲، ۱۳۹٤، صفحات ۹۲ تا ۹۸

بیان ژن تیوردوکسین یک (Trx1) در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس

الهام محمودیان[۱]، احد خلیل‌نژاد[۲]، فاطمه محمودی[۱]، کوروش قره‌گزلی[۳]، داور امانی[۲]*

۱- گروه علوم سلولی-مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- بخش مغز و اعصاب، بیمارستان لقمان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۹/۷

چکیده

سابقه و هدف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری التهابی همراه با زوال در سیستم اعصاب مرکزی و مغز است که اتیولوژی آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است. هدف مطالعه حاضر بررسی و مقایسه سطح بیان ژن *Trx1* (به عنوان یکی از اجزای سیستم ردوکس) در لوکوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و افراد سالم است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، ۶ فرد سالم به عنوان گروه کنترل و ۱۲ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در دو گروه بدون مصرف دارو (۶ نفر) و مصرف کننده داروی اینترفرون بتا (۶ نفر) وارد مطالعه شدند. ابتدای محتوای *ANR* تام لوکوسیت‌های خون محیطی استخراج و ساخت *cDNA* انجام گرفت. سپس، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و تکنیک *Real-time PCR SYBR Green*، تعداد نسخه‌های *mRNA* ژن *Trx1* در گروه‌های بیماران اندزه گیری و نسبت به گروه کنترل سالم مقایسه شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژن *Trx1* در گروه بیماران بدون مصرف دارو نسبت به گروه کنترل سالم حدود دو برابر افزایش داشته است. همچنین، بیان ژن *Trx1* در گروه بیماران مصرف کننده اینترفرون بتا نسبت به گروه بیماران بدون مصرف دارو حدود دو برابر و نسبت به گروه کنترل سالم حدود چهار برابر افزایش داشته است. هرچند این تغییرها از نظر آماری معنادار نیست *(P > 0.05)*.

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه ما نشان می‌دهد که میزان بیان ژن *Trx1* در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس افزایش می‌یابد که به احتمال این تغییرها تحت تأثیر داروهای اینترفرون بتا مصرفی این بیماران نیز قرار می گیرد. با این حال، برای تأیید این فرضیه به انجام مطالعه‌های بیشتری در آینده نیاز است.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اُکسیدان، تیوردوکسین، سیستم ردوکس، مالتیپل اسکلروزیس

Archive of SID

مقدمه:

بیماری مالتیپل اسکلروزیس (multiple sclerosis) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی است که اغلب دوره سنی ۲۰ تا ۴۰ سال را درگیر کرده و باعث ناتوانی در بسیاری از فعالیت‌های روزانه و از دست رفتن قدرت حرکت و همچنین اختلال در سیستم عصبی و بینایی می‌شود. به همین دلیل، امروزه توجه بسیاری از مجامع پزشکی را به خود جلب کرده است(۱،۲). بیماری مالتیپل اسکلروزیس در زنان حدود ده برابر نسبت به مردان شایع‌تر بوده و در سال‌های اخیر شیوع این بیماری در ایران و در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه جهان رو به افزایش بوده است(۳).

براساس شواهد موجود، عوامل ژنتیکی و محیطی مختلفی در بروز بیماری مالتیپل اسکلروزیس دخیل هستند. با این حال، اتیولوژی این بیماری هنوز به طور کامل شناخته نشده است(۴). شواهد حاکی از این است که مالتیپل اسکلروزیس هم به واسطه واکنش‌های التهابی سیستم ایمنی بدن و هم به دلیل فرآیندهای نورودژنراتیو عصبی به وجود می‌آید. در واقع، این بیماری هم یک نارسایی التهابی و هم یک اختلال عصبی تلقی شود که در آن التهاب، آسیب به میلین آکسون و از دست رفتن نورون‌ها و متعاقباً آتروفی سیستم عصبی مرکزی

نویسنده مسئول: داور امانی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، چمران، تهران، ایران
amanid@sbmu.ac.ir
تلفن/دورنگار: ۲۲۴۳۹۹۷۰-۲۱-۹۸+

www.SID.ir

به ناتوانی عصبی و بالینی دائمی منجر می‌شود(۵).

مولکول تیوردوکسین (Thioredoxin, Trx) به همراه تیوردوکسین ردوکتاز (Thioredoxin Reducates, TrxR) و NADPH اجزای سیستم Trx/TrxR هستند که این سیستم به عنوان یکی از تنظیم کننده‌های اصلی سیستم ردوکس (redox system) در بسیاری از فعالیت‌های داخل سلولی نقش کلیدی ایفا می‌کند(۶،۷). حفظ تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها، هموستاز فنوتیپی، عملکردی و آپوپتوزی سلول‌های ایمنی و سلول‌های سرطانی از جمله فعالیت‌هایی هستند که به شدت تحت تأثیر این سیستم Trx/TrxR درون سلولی قرار دارند(۸،۱۱). همچنین دیده شده است که مولکول Trx بواسطه برهم‌کنش با پروتئین باند شونده به آن، نقش حیاتی را در پاسخ‌های سیستم ایمنی، عفونت ویروسی و مرگ سلولی ایفا می‌کند(۱۲).

مطالعه‌ها نشان داده است در بسیاری از بیماری‌ها و نارسایی‌ها از قبیل، بیماری‌های خودایمنی و سرطان‌ها، سیستم ردوکس دچار اختلال می‌شود که با استرس اکسیداتیو (oxidative stress) سلولی همراه بوده و با تغییر در بیان مولکول‌های درگیر در این سیستم مشخص می‌شود. به عنوان مثال، مشخص شده است که افزایش بیان Trx و سطح سرمی آن در انواع بدخیمی‌ها با کاهش بقای (survival) و پیش‌آگهی (prognosis) ضعیف بیماری ارتباط دارد. (۱۳،۱۵) همچنین، وجود و نقش استرس اکسیداتیو سلولی در بروز بیماری‌های نورودژنراتیو از قبیل؛ بیماری مالتیپل اسکلروزیس توسط بسیاری از مطالعه‌ها به اثبات رسیده است(۱۶). به عنوان مثال، مشاهده شده است که میزان بیان و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی در مبتلایان به مالتیپل اسکلروزیس کاهش می‌یابد(۱۷).

مولکول Trx دارای دو ایزوفرم Trx1، Trx2 و Trx3 است که ایزوفرم Trx1 در همه سلول‌های بدن بیان می‌شود. در مطالعه حاضر، برای نخستین بار میزان بیان ژن Trx1 در سطح mRNA در لوکوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس (در دو گروه بیماران تازه تشخیص داده شده یا بدون مصرف دارو و بیماران مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا) در ایران مورد ارزیابی شده و نسبت به افراد کنترل سالم مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

بیماران: ۱۲ فرد مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس که بیماری آن‌ها از نظر بالینی قطعی بود، به دو گروه تقسیم شدند: گروه اول، شش بیمار تازه تشخیص داده شده یا بدون مصرف دارو (طی سه ماه پیش از ورود به مطالعه) با دامنه سنی ۴۲–۱۸ سال و گروه دوم، شش بیمار مصرف‌کننده داروهای اینترفرون بتا با دامنه سنی ۴۷–۲۹ سال. تشخیص بیماری مالتیپل اسکلروزیس از سوی یک متخصص مغز و اعصاب انجام گرفته بود. همچنین، تشخیص بالینی مالتیپل اسکلروزیس در همه این بیماران با توجه به معیارهای تشخیصی جهانی مک‌دونالد (McDonald) و همکاران (۱۸) تایید شد.

کنترل: گروه کنترل شامل شش فرد سالم با دامنه سنی ۳۲–۲۵ سال براساس معیارهای یکسان‌سازی با گروه بیمار انتخاب شدند. افرادی که داروهای کورتیکواستروئید و یا داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی دریافت کرده بودند و نیز افرادی که سابقه خانوادگی بیماری‌های خود ایمنی و یا سرطان داشتند، در مطالعه وارد نشدند.

ملاحظه‌های اخلاقی

تمامی افراد شرکت کننده در مطالعه، رضایت و آگاهی کامل خود را به صورت کتبی اعلام کردند و تمامی مراحل کار زیر نظر کمیته اخلاق مستقر در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام پذیرفت. همچنین، مشخصات و اطلاعات شخصی افراد شرکت کننده به طور کامل محرمانه مانده است. این پروژه، هیچ هزینه مالی برای بیماران نداشته است.

نمونه‌گیری و جداسازی بافی‌کوت:

نمونه‌گیری از بیماران با هماهنگی پزشک معالج و رضایت بیمار در بیمارستان لقمان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت. مقدار ۵ سی‌سی (cc) نمونه خون در فالکون ۱۵ سی‌سی حاوی ضد انعقاد جمع‌آوری و به سرعت به آزمایشگاه تحقیقاتی گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انتقال داده شد. برای جداسازی بافی‌کوت، نمونه‌ها در rpm ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس، ۶۰۰ میکرولیتر (µl) از لایه بافی‌کوت بین گلبول قرمز و پلاسما برداشت و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری عاری از آنزیم ریبونوکلئاز (RNase free) انتقال و تا زمان برای استخراج RNA تام total RNA و ساخت cDNA در دمای ۲۰– نگه‌داری شد.

استخراج RNA تام:

برای استخراج RNA تام از کیت مخصوص RNXTM-PLUS و بر اساس رهنمودهای شرکت سازنده کیت (سیناژن، ایران) استفاده شد. به طور خلاصه، به میکروتیوب حاوی بافی‌کوت نمونه به میزان ۱۰۰۰ µl از بافر RNXTM-PLUS خنک (دمای ۸–۴ درجه سانتی‌گراد) اضافه و به مدت ۱۰–۵ ثانیه ورتکس و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس، به میزان ۲۰۰ µl کلروفرم اضافه، به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، ۴۰۰ µl از فاز شفاف فوقانی حاوی RNA با ۴۰۰ µl ایزوپروپانول مخلوط، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس با rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پس از آن، ۱۰۰۰ µl اتانول ۷۵ درصد به پلت (حاوی RNA) اضافه، و با rpm ۷۵۰۰ به مدت هشت دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد. سپس، پلِت در میزان ۵۰ µl آب تیمار شده با DEPC (RNase free) مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵–۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و حل شد. در نهایت، برای از بین بردن محتوای DNA آن از کیت مخصوص حاوی آنزیم DNase و براساس رهنمودهای سازنده کیت (سیناژن، ایران) استفاده شد.

ساخت cDNA

برای ساخت cDNA از کیت مخصوص ترانسکریپتاز معکوس (Maxime RT Premix) و براساس رهنمودهای سازنده کیت (iNtRON BIOTECHNOLOGY, South Korea) استفاده شد. به طور خلاصه، به میزان ۴ µl از محلول حاوی RNA تام در داخل میکروتیوب‌های مخصوص واکنش RT-PCR (موجود در کیت) اضافه و با ۱۶ µl آب به حجم نهایی ۲۰ µl رسانده شده و به مدت دو دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در این کیت به طور تقریبی تمامی مواد لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس (به استثنای آب و RNA)، در داخل میکروتیوب‌های ml ۰/۲ موجود است. در مرحله بعد با استفاده از ترموسایکلر و با پروفایل حرارتی ۴۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت یک ساعت (ساخت cDNA) و به دنبال آن دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (برای غیرفعال کردن RTase) واکنش RT-PCR انجام شد. در نهایت، پس از ساخت cDNA، با اضافه کردن ۴۰ µl از آب حجم نهایی محلول cDNA ساخته شده به ۶۰ µl رسانده شده و در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

ارزیابی بیان نسبی ژن Trx1 با Real-time PCR

ابتدا برای بررسی تأیید وجود cDNA و کنترل کیفی نمونه‌ها و نیز برای دستیابی به پروفایل دمایی مناسب برای ژن‌های مورد نظر، تعدادی نمونه cDNA ساخته شده به طور تصادفی انتخاب شد و واکنش PCR در ترموسایکلر مخصوص (Eppendorf Mastercycler gradient, Biotech Co., Germany) با استفاده از کیت مخصوص (RealQ Plus 2x Master Mix Green) و براساس رهنمودهای شرکت سازنده کیت (Ampliqon, Denmark) انجام شد.

برای انجام Real-time PCR و ارزیابی بیان کمی–نسبی ژن Trx1 از پرایمر اختصاصی این ژن و مسترمیکس مخصوص (DNA Master plus SYBR Green I) براساس رهنمودهای شرکت سازنده کیت (Ampliqon, Denmark) استفاده شد. همچنین، ژن بتا–اکتین (β-Actin) برای نرمالیزه کردن داده‌ها استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن Trx1 و β-Actin در جدول یک آورده شده است(۱۹،۲۰).

Archive of SID

www.SID.ir

پروفایل دمایی مورد استفاده برای Real-time PCR به شرح زیر است: با استفاده از ترموسایکلر مخصوص (Corbett RG ۶۰۰۰, Australia)، ابتدا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای فعال شدن مستر میکس، سپس، تکثیر DNA ژن مورد نظر بر اساس پروفایل دمایی؛ ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه (برای دو رشته شدن DNA)، دمای اتصال پرایمر (annealing) به مدت ۱۰ ثانیه (۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ژن Trx1 و ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ژن β-Actin)، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر (extension) استفاده شد. در طول واکنش با استفاده از نرم‌افزار Rotor-Gene ۶۰۰۰ Series Software ۱,۷ نمودار حاصل از تکثیر ژن‌های مورد نظر ثبت انجام گرفت.

در نهایت، برای سنجش کیفی محصول واکنش، نمونه‌های DNA روی ژل آگاروز ۲ درصد بارگذاری و با ولتاژ ۷۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شده و با استفاده از دستگاه ژل داک (gel doc) رویت و از نظر تک باند بودن تأیید شدند.

جدول یک- توالی پرایمرهای استفاده شده برای انجام Real-time PCR

ژن	پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال (C°)	مرجع
Trx1	F	5'-TGGTGAAGCAGATCGAGAGCAAGA-3'	۵۸	۱۹
	R	5'ACCACGTGGCTGAGAAGTCAACTA-3'		
β-Actin	F	5'-CCTGGGCATGGAGTCCTGT-3'	۵۶	۲۰
	R	5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3'		

تجزیه و تحلیل داده‌ها:

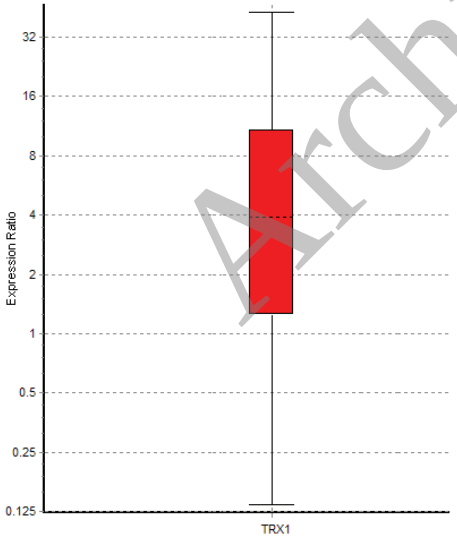
برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به Real-time PCR و محاسبه مرتبه بیان ژن Trx1 در گروه‌های بیمار نسبت به گروه کنترل از نرم افزار REST ۲۰۰۹ (Relative Expression Software Tool, QIAGEN, Germany) استفاده شد. یافته‌ها بر اساس میانگین و خطای استاندارد و به صورت نمودار گزارش شده است. برای رسم نمودارها از نسخه پنج نرم افزار Graph Pad Prism (San Diego, California, USA) نیز استفاده شد. حدود اطمینان ۹۵% بوده و از نظر آماری اختلاف میانگین با $P > ۰/۰۵$ به منزله معنادار بودن در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

اطلاعات دموگرافیک

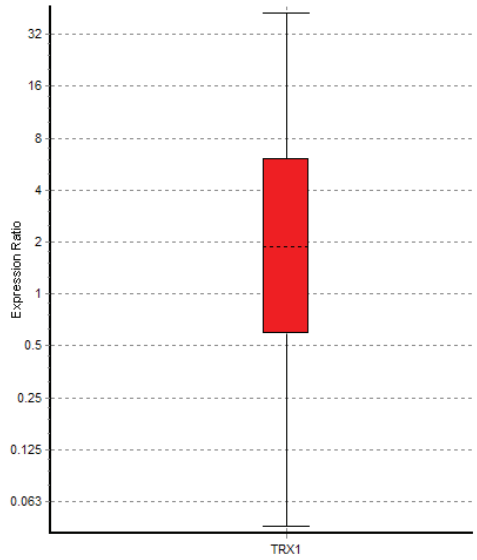
گروه کنترل شامل شش فرد سالم (چهار زن و دو مرد) با دامنه سنی ۳۲-۲۵ سال و متوسط سن ۲۷/۵±۰/۹۹۲ سال بود. بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس شامل دسته اول، شش بیمار تازه تشخیص داده شده یا بدون مصرف دارو (چهار زن و دو مرد) با دامنه سنی ۴۲-۱۸ سال و متوسط سن ۳۱/۸۳±۳/۲۸۰ سال و دسته دوم، ۶ بیمار مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا (چهار زن و دو مرد) با دامنه سنی ۴۷-۲۹ سال و متوسط سن ۳۴/۵۰±۲/۹۹۷ سال.

نتایج ارزیابی بیان ژن Trx1 در سلول‌های خونی محیطی:



Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
B Actin	REF	0.725	1.000			
TRX1	TRG	0.7675	3.282	0.740 - 14.678	0.158 - 38.104	0.102

نمودار ۲- میزان بیان ژن Trx1 در لوکوسیت‌های خون محیطی گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا (IFNβ) نسبت به گروه کنترل سالم



Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
B Actin	REF	0.7325	1.000			
TRX1	TRG	0.7633	1.979	0.365 - 14.212	0.088 - 37.575	0.372

نمودار ۱- میزان بیان ژن Trx1 در لوکوسیت‌های خون محیطی گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس تازه تشخیص داده شده یا بدون مصرف دارو نسبت به گروه کنترل سالم

Archive of SID

www.SID.ir

با استفاده از تکنیک Real-time PCR میزان نسخه‌های mRNA ژن Trx1 در سلول‌های خونی محیطی گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس بدون مصرف دارو و گروه بیماران مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا نسبت به بیان آن در گروه کنترل سالم و نیز در گروه بیماران مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا نسبت به گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس بدون مصرف دارو، ارزیابی شد.

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
B Actin	REF	0.7242	1.000			
TRX1	TRG	0.7675	1.658	0.309 - 8.368	0.113 - 25.204	0.444

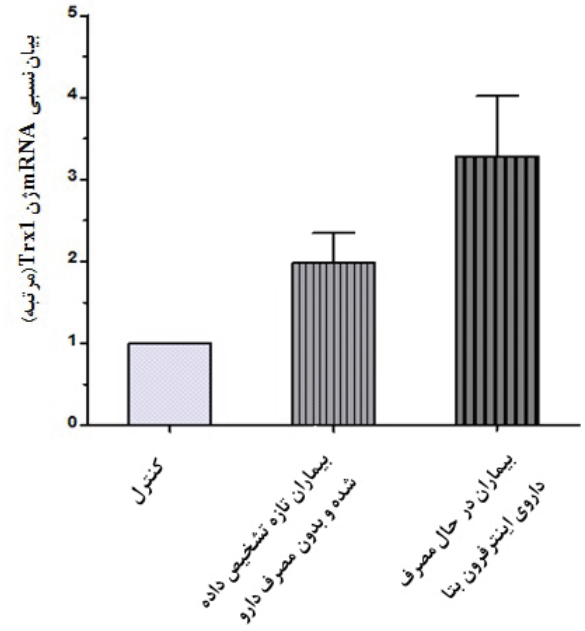
نمودار۳- میزان بیان ژن Trx1 در لوکوسیت‌های خون محیطی گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مصرف‌کننده داروهای اینترفرون بتا (IFNβ) نسبت به گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس تازه تشخیص داده شده یا بدون مصرف دارو

نتایج نشان داد در افراد مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس که بیماری آن‌ها به تازگی تشخیص داده شده و یا هیچ دارویی برای درمان دریافت نکرده‌اند، بیان ژن Trx1 نسبت به افراد کنترل سالم حدود دو برابر افزایش داشته است (نمودار یک). با این حال، این افزایش از نظر آماری معنادار نیست (P value = 0.372). همچنین، مشاهده شد که بیان ژن Trx1 در سلول‌های خونی محیطی گروه بیماران مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا نسبت به گروه کنترل سالم حدود چهار برابر افزایش داشته است (نمودار دو). با این حال، این افزایش نیز از نظر آماری معنادار نیست (P value = 0.102). علاوه بر این، بیان ژن Trx1 در سلول‌های خونی محیطی گروه بیماران مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا نسبت به گروه بیماران بدون مصرف دارو (یا تازه تشخیص داده شده) حدود دو برابر افزایش نشان داد (نمودار سه). با این حال، این افزایش نیز از نظر آماری معنادار نیست.(P value = 0.444)

همانطور که در نمودار چهار دیده می‌شود، بیان ژن Trx1 در گروه بیماران بدون مصرف دارو (یا تازه تشخیص داده شده) نسبت به افراد سالم افزایش آماری غیر معناداری داشته است و این افزایش در بیان ژن Trx1 در گروه بیماران مصرف‌کننده داروهای اینترفرون بتا نسبت به افراد سالم به مراتب بیش‌تر شده است. بنابراین، به نظر می‌رسد مصرف داروهای اینترفرون بتا باعث تقویت افزایش بیان این ژن در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس شده باشد.

بحث

مطالعه‌های مختلف نشان داده است که مولکول Trx به عنوان یکی از اجزای سیستم ردوکس می‌تواند در بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی و پاتوژنیسیته سرطان، بیماری‌های خود ایمنی و دیابت نقش داشته باشد و حتی



نمودار ۴- مقایسه میزان بیان ژن Trx1 در لوکوسیت‌های خون محیطی گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس تازه تشخیص داده شده یا بدون مصرف دارو و گروه گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا (IFNβ) نسبت به گروه کنترل سالم

می‌توان از این مولکول به عنوان یک بیومارکر در بسیاری از این بیماری‌ها استفاده کرد.(۲۱،۲۳) بنابراین ارزیابی این ژن در بسیاری از بیماری‌ها حائز اهمیت است.

در مطالعه حاضر، با استفاده از تکنیک Real-time PCR میزان بیان ژن Trx1 در سطح mRNA در سلول‌های خون محیطی مبتلایان به بیماری مالتیپل اسکلروزیس ارزیابی شد. همچنین، در این مطالعه بیماران به دو گروه تقسیم شده بودند تا تغییرات بیان ژن مورد نظر نه تنها در موارد تازه تشخیص داده شده بیماری مالتیپل اسکلروزیس بررسی شود (گروه اول بیماران)، بلکه تأثیر احتمالی مصرف داروهای متداول این بیماری از قبیل، اینترفرون بتا (گروه دوم بیماران) روی بیان ژن Trx1 نیز مورد سنجش قرار گیرد. نتایج مطالعه نشان داد میزان بیان ژن Trx1 در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس نسبت به افراد سالم (کنترل) افزایش می‌یابد که با مصرف داروهای اینترفرون بتا، این افزایش بیش‌تر می‌شود. در واقع، براساس یافته‌های این مطالعه، چنین به نظر می‌رسد که در بیماری مالتیپل اسکلروزیس بیان ژن Trx1 بنا به دلایل نامعلوم (در حال حاضر) دچار افزایش شده و مصرف داروهای اینترفرون بتا این افزایش را تشدید می‌کند. با این حال، تغییرات Trx1 مشاهده شده در مطالعه حاضر از نظر آماری معنادار نبوده است که به احتمال این امر می‌تواند به دلیل کوچک بودن اندازه جمعیت مورد مطالعه بوده باشد. به عبارتی دیگر، اگر اندازه جمعیت مورد بررسی در مطالعه‌ها آتی بزرگ‌تر شود، ممکن است تغییرات آماری معناداری در سطح بیان ژن Trx1 در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مشاهده شد.

شاید بتوان گفت، مطالعه پنیسی (Pennisi) و همکاران تنها پژوهشی باشد که بیان مولکول Trx1 در سطح پروتئین را در افراد مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس مطالعه کرده است.(۲۴) بدین ترتیب، تا جایی که ما اطلاع داریم مطالعه حاضر تنها مطالعه‌ای است که تغییرات بیان ژن Trx1 در سطح mRNA را در افراد مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس و مهم‌تر این‌که در گروه بیماران بدون مصرف دارو و بیماران مصرف کننده داروهای اینترفرون بتا بررسی کرده

Archive of SID

www.SID.ir

است.

سازگار با یافته‌های مطالعه حاضر، پنیسی و همکاران نشان دادند که سطح پروتئین Trx1 در سرم بیماران و مایع مغزی- نخاعی افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس نسبت به افراد سالم به طور معناداری افزایش دارد.(۲۴)همچنین، آرودین (Arodin) و همکاران با مطالعه روی ۱۲۰ بیمار مبتلا به آلزایمر گزارش کردند که سطح پروتئین Trx1 در مایع مغزی- نخاعی افراد بیمار دچار اختلال خفیف شناختی (mild cognitive impairment)در مقایسه با مرحله اولیه بیماری کاهش داشته است(۲۵). بنابراین، مطالعه ما سازگار با یافته‌های پنیسی و همکاران (۲۴) و آرودین و همکاران (۲۵) حاکی از این است که این تغییرات در بیان Trx1 به احتمال منجر به اختلال در هموستاز سیستم ردوکس در روند پیشرفت بیماری‌های زوال عصبی از جمله مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس می‌شود که با پیش‌برد زوال سلول‌های عصبی یا میلین و یا با ایجاد اختلال در سیستم ایمنی در پاتوژنیسیته این بیماری‌ها نقش بسزایی ایفا می‌کند(۲۴).

در مقابل، بیان mRNA و پروتئین Trx1 در آلزایمر و برخی بیماری‌های خود ایمنی از قبیل، روماتوئید ارتریت (RA) اریتماتوز لوپوس سیستمیک (SLE) و همچنین در سرطان‌ها و عفونت‌ها افزایش می‌یابد.(۲۶،۲۸) به عنوان مثال، جیکی‌موتو (Jikimoto) و همکاران نشان دادند که سطح مولکول Trx در پلاسما و مایع سینوویال (Synovial fluid) در افراد مبتلا به RA به طور معناداری بیشتر از افراد سالم بوده و با میزان فعالیت بیماری ارتباط معناداری داشته است.(۲۶) همچنین، آکترین (Akterin) و همکاران مشاهده کردند که در مغز افراد مبتلا به آلزایمر بیان GRX1 نورونی افزایش داشته و در مقابل بیان Trx1 نورونی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد که این عدم هماهنگی می‌تواند در پاتوژنز بیماری آلزایمر دخالت داشته باشد.(۲۸) بنابراین، یافته‌های جیکی‌موتو و همکاران و آکترین و همکاران مبنی بر کاهش بیان Trx1 به ترتیب در یک بیماری خود ایمنی (۲۶) و زوال عصبی (۲۸) با یافته‌های ما ناسازگار است.

بیماری مالتیپل اسکلروزیس در اثر نفوذ سلول‌های ایمنی از جمله؛ لنفوسیت‌های T، ائوزینوفیل‌ها و دیگر سلول‌های التهابی به داخل سیستم اعصاب مرکزی و متعاقباً تخریب میلین و اکسون ایجاد می‌شود. در نخستین مرحله، التهاب بسیار زود گذر و کوتاه بوده و فرآیند بازسازی میلین اتفاق می‌افتد. اما این مکانیسم ماندگار نیست. با گذشت زمان شرایط جدیدی بر رویکردهای سلولی حاکم می‌شود که باعث فعال شدن سلول‌های میکروگلیال می شود(۲۹). مونوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های طبیعی و یا نئوپلاستیک می‌توانند مولکول Trx1 ترشح کنند(۳۰, ۳۱)، که این Trx1 ترشح شده چندین فعالیت شبه سایتوکاینی از خود نشان می‌دهد (۳۲). به عنوان مثال، Trx1 ترشح شده توسط ویروس لنفوتروفیک T انسانی (HTLV) که سبب تغییر سلول‌های T می‌شود، به طور خاص سبب القای گیرنده IL-2 می‌شود.(۳۳, ۳۴) علاوه بر این، مطالعه‌های نشان داده است که Trx1 به عنوان یک پروتئین کموتاکتیک با دیگر کموکاین‌ها قابل مقایسه است(۳۵).

داروهای ایمونومدولاتور مانند اینترفرون بتا در دوره‌های مختلف بیماری مالتیپل اسکلروزیس می‌توانند تا حدی تنظیم کننده بسیای از سایتوکاین‌ها باشند. (۳۶, ۳۷) گوبل (Goebel) و همکاران اثر اینترفرون بتا بر سطح سایتوکاین‌های التهابی را در هشت فرد سالم مطالعه کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که تزریق اینترفرون بتا به افزایش فوری در IL-6، IL-10-TNF-α در پلاسما منجر می‌شود(۳۸). نیکولتی (Nicoletti) و همکاران با مطالعه در مورد تأثیر درمان اینترفرون بتا کوتاه مدت روی سطح سایتوکاین‌های خون در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس دریافتند که سطح سرمی IL-6، IFN-γ و IL-10 در این بیماران تحت درمان با اینترفرون بتا افزایش می‌یابد.(۳۹) بنابراین می‌توان گفت به احتمال داروهای اینترفرون بتا در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس برای بازگرداندن شرایط فیزیولوژیک طبیعی سبب افزایش در میزان بیان Trx1 می‌شوند. با توجه به مطالعه گوبل و همکاران و نیکولتی و همکاران، شاید در مطالعه ما افزایش بیان Trx1 مشاهده شده در گروه بیماران مصرف کننده اینترفرون بتا به نوعی بیانگر ارتباط یا نقش این مولکول در محور تنظیم پاسخ‌های ایمنی بوده باشد. همچنین، یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند فرضیه دیگری را در خصوص نقش پاتوژنیک Trx1 در عفونت و التهاب بیان می‌دارد که بر اساس آن، تغییر در بیان Trx1 به احتمال زیاد در هماهنگی با دیگر کموکاین‌ها می‌تواند در به کارگیری سلول‌ها در بروز التهاب و پیشبرد بیماری مالتیپل اسکلروزیس نقش داشته باشد(۴۰, ۴۱). با این حال، برای تأیید این فرضیه‌ها باید مطالعه‌های بیش‌تری در آینده انجام بگیرد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در قالب پروژه پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم الهام محمودیان و با پشتیبانی مالی طرح پژوهشی به شماره ۱۳/۷۱۴ مصوب در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است. نتایج این پژوهش به تمامی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس تقدیم شود و پژوهشگران از همکاری تمامی افراد شرکت کننده و نیز از رهنمودهای سرکار خانم دکتر نریمان مصفا تشکر و سپاسگزاری خود را اعلام می‌دارند.

منابع:

1. Fox RJ, Bethoux F, Goldman MD, Cohen JA. Multiple sclerosis: advances in understanding, diagnosing, and treating the underlying disease. Cleve Clin J Med. 2006;73(1):91-102.

2. Gonen O, Moriarty DM, Li BS, Babb JS, He J, Listerud J, et al. Relapsing-remitting multiple sclerosis and whole-brain N-acetylaspartate measurement: evidence for different clinical cohorts initial observations. Radiology. 2002;225(1):261-8.

3. Rezaali S, Khalilnezhad A, Naser Moghadasi A, Chaibakhsh S, Sahraian MA. Epidemiology of multiple sclerosis in Qom: Demographic study in Iran. Iran J Neurol. 2013;12(4):136-43.

4. Khalilnezhad A, Zahednasab H, Khodabandehloo H, Mahmoudian E, Azar-Abdar T, Balood M, et al. Diagnostic Biomarkers in Multiple Sclerosis. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2014;21(7):288-311.

5. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. N Engl J Med. 2003 Jul 10;349(2):139-45.

6. Yoshihara E, Chen Z, Matsuo Y, Masutani H, Yodoi J. Thiol redox transitions by thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cell signaling. Methods Enzymol. 2010;474:67-82.

7. Watanabe R, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. Pharmacol Ther. 2010;127(3):261-70.

8. Soini Y, Kahlos K, Napankangas U, Kaarteenaho-Wiik R, Saily M, Koistinen P, et al. Widespread expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma. Clin Cancer Res. 2001;7(6):1750-7.

9. Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. Biochem Biophys Res Commun. 2010 May 21;396(1):120-4.

10. Powis G, Mustacich D, Coon A. The role of the redox protein thioredoxin

Archive of SID
www.SID.ir

in cell growth and cancer. Free Radic Biol Med. 2000;29(3-4):312-22.
11. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. Antioxid Redox Signal. 2007;9(1):25-47.
12. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. Free Radic Biol Med. 2014;66:75-87.
13. Penney RB, Roy D. Thioredoxin-mediated redox regulation of resistance to endocrine therapy in breast cancer. Biochim Biophys Acta. 2013;1836(1):60-79.
14. Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Powis G, Souglakos J, Sivridis E, et al. Thioredoxin expression is associated with lymph node status and prognosis in early operable non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2001;7(10):3087-91.
15. Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, et al. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. J Lab Clin Med. 2003;142(1):46-51.
16. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomed Pharmacother. 2004;58(1):39-46.
17. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2002;1(4):232-41.
18. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol. 2001;50(1):121-7.
19. Ogata FT, Batista WL, Sartori A, Gesteira TF, Masutani H, Arai RJ, et al. Nitrosative/oxidative stress conditions regulate thioredoxin-interacting protein (TXNIP) expression and thioredoxin-1 (TRX-1) nuclear localization. PLoS One. 2013;8(12):e84588.
20. Javeri A, Ghaffarpour M, Taha MF, Houshmand M. Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis. Med Oncol. 2013;30(1):413.
21. Yoshihara E, Masaki S, Matsuo Y, Chen Z, Tian H, Yodoi J. Thioredoxin/Txnip: Redoxisome, as a Redox Switch for the Pathogenesis of Diseases. Front Immunol. 2014;4:514.
22. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 2001;31(11):1287-312.
23. Berghella AM, Pellegrini P, Del Beato T, Ciccone F, Contasta I. The potential role of thioredoxin 1 and CD30 systems as multiple pathway targets and biomarkers in tumor therapy. Cancer Immunol Immunother. 2011;60(10):1373-81.
24. Pennisi G, Cornelius C, Cavallaro MM, Salinaro AT, Cambria MT, Pennisi M, et al. Redox regulation of cellular stress response in multiple sclerosis. Biochem Pharmacol. 2011;82(10):1490-9.
25. Arodin L, Lamparter H, Karlsson H, Nennesmo I, Bjornstedt M, Schroder J, et al. Alteration of thioredoxin and glutaredoxin in the progression of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2014;39(4):787-97.26.
Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshiba M, Kanagawa S, Morinobu S, Morinobu A, et al. Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. Mol Immunol. 2002;38(10):765-72.
27. Song W, Yuan J, Zhang Z, Li L, Hu L. Altered glutamate cysteine ligase activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. Exp Ther Med. 2014;8(1):195-200.
28. Akterin S, Cowburn RF, Miranda-Vizuete A, Jimenez A, Bogdanovic N, Winblad B, et al. Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease. Cell Death Differ. 2006;13(9):1454-65.
29. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet. 2008;372(9648):1502-17.
30. Ericson ML, Horling J, Wendel-Hansen V, Holmgren A, Rosen A. Secretion of thioredoxin after in vitro activation of human B cells. Lymphokine Cytokine Res. 1992;11(5):201-7.
31. Rubartelli A, Bonifaci N, Sitia R. High rates of thioredoxin secretion correlate with growth arrest in hepatoma cells. Cancer Res. 1995;55(3):675-80.
32. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. Annu Rev Immunol. 1997;15:351-69.
33. Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, et al. ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. EMBO J. 1989; 8(3):757-64.
34. Teshigawara K, Maeda M, Nishino K, Nikaido T, Uchiyama T, Tsudo M, et al. Adult T leukemia cells produce a lymphokine that augments interleukin 2 receptor expression. J Mol Cell Immunol. 1985;2(1):17-26.
35. Bertini R, Howard OM, Dong HF, Oppenheim JJ, Bizzarri C, Sergi R, et al. Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. J Exp Med. 1999;189(11):1783-9.
36. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology. 1996;46(4):907-11.
37. Neilley LK, Goodin DS, Goodkin DE, Hauser SL. Side effect profile of interferon beta-1b in MS: results of an open label trial. Neurology. 1996;46(2):552-4.
38. Goebel MU, Baase J, Pithan V, Exton M, Saller B, Schedlowski M, et al. Acute interferon beta-1b administration alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, plasma cytokines and leukocyte distribution in healthy subjects. Psychoneuroendocrinology. 2002;27(8):881-92.
39. Nicoletti F, Di Marco R, Patti F, Zaccone P, L'Episcopo MR, Reggio E, et al. Short-term treatment of relapsing remitting multiple sclerosis patients with interferon (IFN)-beta1B transiently increases the blood levels of interleukin (IL)-6, IL-10 and IFN-gamma without significantly modifying those of IL-1beta, IL-2, IL-4 and tumour necrosis factor-alpha. Cytokine. 2000;12(6):682-7.
40. Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. J Biol Chem. 1992 5;267(34):24161-4.
41. Endoh M, Kunishita T, Tabira T. Thioredoxin from activated macrophages as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1993;192(2):760-5.

Archive of SID

www.SID.ir