Archive of SID

مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره دوم، ۱۳۸۸
صفحات ۱۱۶-۱۱۳

Original Article

بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن بتا ۱ رسپتور اینتر لوکین ۱۲ و بیماری سل ریوی در بین جمعیت ایرانی

نورالهدی سعدایی جهرمی[۱*]، دکتر پریسا فرنیا[۲]، دکتر محمد کارگر[۱]، دکتر مهدی کاظم پور[۲]، دکتر جمیله نوروزی[۳]، دکتر محمد رضا مسجدی[۲]، دکتر علی اکبر ولایتی[۲]

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، [۲]مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی ،پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، [۳]گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری سل ریوی یکی از مهم ترین عوامل عفونی منجر به مرگ و میر جهانی است. از بین مبتلایان به این بیماری تنها ۱۰٪ از افراد آلوده شده با باکتری مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس علائم بیماری را از خود بروز می دهند. این مساله نقش عوامل ژنتیکی را در حساسیت ابتلا به این بیماری را نشان می‌دهد. هدف از این پژوهش تعیین پلی مورفیسم های ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ در بین بیماران مبتلا به سل ریوی است.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی ـ توصیفی بر روی ۱۲۰ بیمار سل ریوی و ۱۶۷کنترل سالم انجام شد. پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در دو ناحیه ۱۶۳۷G/A + و ۱۶۶۴C/T+ با استفاده از روش PCR-RFLP تعیین گردید.

یافته ها: در بین افراد بیمار و سالم مورد پژوهش هیچ گونه تفاوت عمده ای در توالی آللی نواحی ۱۶۳۷G/A+ و ۱۶۶۴C/T+ مشاهده نشد ($p \leqslant ۰/۰۵$). همچنین هیچ‌گونه ارتباط معناداری بین پلی مورفیسم ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و حساسیت به سل ریوی وجود نداشت.

نتیجه گیری : با وجود عدم ارتباط بین پلی مورفیسم‌های ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و سل ریوی به دلیل نقش موثر عوامل ژنتیکی درحساسیت نسبت به بیماری‌ها، انجام پژوهش‌های بیشتر در این مورد پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: اینترلوکین ۱۲، پلی مورفیسم، مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس، رسپتور بتا

دریافت مقاله: زمستان ۸۷ پذیرش برای چاپ: بهار ۸۸

مقدمه

بیماری سل (توبرکیلوسیس) پس از ایدز مهم‌ترین بیماری عفونی کشنده در دنیا شناخته شده است. سالیانه حدود ۳ میلیون نفر بر اثر این بیماری خطرناک و مقاوم جان خود را از دست می‌دهند و تقریبا یک سوم جمعیت دنیا به مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس آلوده هستند (۱). یکی از نکات پیچیده و مجهول درباره بیماری سل ریوی این نکته است که اکثریت افراد آلوده به باکتری، علائم کلینیکی بیماری را از خود بروز نمی دهند و این علائم فقط در ۱۰٪ از افراد ظاهر می‌شوند. در همین راستا بررسی‌های انجام شده روی دو قلوها و تحقیقات نژادی نشان دادند که تفاوت‌های ژنتیکی میزبان در پاسخ ایمنی بدن ممکن است روی حساسیت به عفونت مایکوباکتریایی تاثیر گذار باشد (۱).

اینترلوکین ۱۲ یک سیتوکین هترودایمر تشکیل شده از دو زیر واحد گلیکوپروتئینی به نام‌های P35 و P40 است که با پیوند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل می‌باشند. این سیتوکین به وسیله سلولهای دندرتیک و فاگوسیت‌های فعال شده ترشح می‌شود و نقشی اساسی را در تحریک پاسخ های ایمنی سلول‌های T کمکی نوع ۱ و ایمنی سلولی ایفا می‌کند. تکثیر سلول‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی، افزایش فعالیت سیتولتیک سلول‌های کشنده طبیعی و سلول‌های T و همچنین تولید اینترفرون گاما به واسطه سلول‌های T و القای سلول‌های کشنده طبیعی مهم‌ترین

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

www.SID.ir

Archive of SID

عملکردهای بیولوژیک اینترلوکین ۱۲ محسوب می شوند (۲).

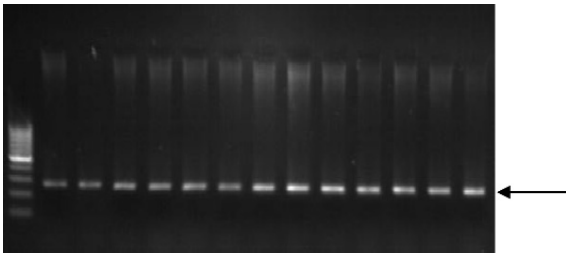
تولید اینترفرون گامای القا شده با اینترلوکین ۱۲ یک ارتباط مهم را بین ایمنی ذاتی و سلولی ایجاد می‌کند. نکته مورد توجه اغلب دانشمندان، ارتباط عدم حضور P40 یا رسپتور بتا ۱ این سیتوکین در مقایسه با عدم حضور رسپتور بتا ۲(P35) با انتشار بیماری توبرکیلوسیس می‌باشد. این مساله منجر به مطالعات گسترده و وسیع‌تری در زمینه نقش سیتوکین‌های وابسته به زیر واحد P40 و سایر سیتوکین‌های خانواده اینترلوکین ۱۲ مثل اینترلوکین ۲۷ در پاسخ به عفونت مایکوباکتریایی شد (۲).

پژوهش های انجام شده بر روی نقایص ژنتیکی زیر واحد P40، اهمیت مطالعه زیر واحدهای اینترلوکین ۱۲ را نشان می‌دهد. هدف از این پژوهش، ارزیابی پلی مورفیسم‌ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ در افراد سالم و مقایسه آن در افراد مبتلا به سل ریوی در جمعیت ایرانی است.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۱۲۰ بیمار دارای بیماری سل ریوی (اسمیر مثبت) و ۱۶۷ فرد سالم (کنترل) انجام شد. از تمامی افراد مورد پژوهش، ۳ میلی‌لیتر خون محیطی تهیه و در لوله حاوی اتیلن دی آمین ترا استیک اسید نگهداری گردید.

ب) تعیین ژنوتیپ با استفاده از *PCR-RFLP*: استخراج ژنوم با استفاده از روش فنل-کلروفرم و با استفاده از پروتکل فایکول-هایپگ انجام گردید. پس از مشاهده کیفیت و کمیت DNA روی ژل آگارز، قطعه مورد نظر با استفاده از روش PCR تکثیر گردید. به این منظور مخلوطی ۱ میکرولیتر dNTPs، ۲-۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۵ میکرولیتر بافر، ۰/۰۱ حجم DMSO، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر و مقدار DNA با توجه به کیفیت آن بین ۳-۰/۵ میکرولیتر تهیه شد و حجم نهایی با آب به ۵۰ میکرولیتر رسید.



شکل ۱: محصول PCR حاصل از تکثیر یک قطعه ۲۶۴ جفت بازی ژن بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ برای استفاده در RFLP.

برای این مطالعه در توالی‌های کد کننده ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی به نام‌های ۱۶۳۷G/A+ و ۱۶۶۴C/T+ که باعث جهش‌های بی معنی می‌شود مشخص گردید. برای تکثیر این دو ناحیه از جفت پرایمرهای: '5-cct-3' و '5-ggctgtggtagcccag-3' و '5-ggaagcgcagtgcagtgcatg-3' استفاده شد.

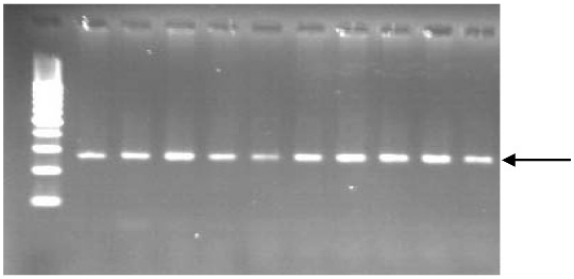
واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ دقیقه انجام شد. سپس واسرشت شدن در دمای ۹۵ در جه سانتی گراد، اتصال پرایمر در ۵۷ تا ۵۸ درجه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه (همگی ۳۰ ثانیه) انجام شد. پس از ۳۰ چرخه PCR، طویل شدن نهایی در حرارت ۷۶ درجه و به مدت ۶ دقیقه انجام شد. در نهایت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در آگارز ۲٪ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). در مرحله بعد با استفاده از آنزیم های برش دهنده *BsrI* و *TaiI* هضم محصولات PCR برای شناسایی نواحی ۱۶۳۷G/A + و ۱۶۶۴C/T+ انجام شد. برای این منظور ۱۶ ساعت گرماگذاری در حرارت ۶۵ درجه انجام و سپس غیرفعال سازی آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه انجام و نتایج با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۲/۵٪ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲ و ۳).

ج) آنالیز آماری: آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون‌های دقیق فیشر و مربع کای انجام شد. همچنین نتایج بدست آمده با استفاده از معادله هاردی-واینبرگ مورد آنالیز قرار گرفت. مرز معنی‌داری در $p \leqslant ۰/۵$ قرار داده شد.

$$(p_1 + \cdots + p_n)^n = \sum_{k_1,\ldots,k_n\,:\,k_1+\cdots+k_n=n} \binom{n}{k_1,\ldots,k_n} p_1^{k_1} \cdots p_n^{k_n}$$

یافته ها

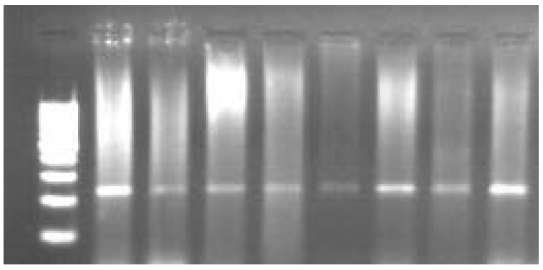
در بررسی افراد بیمار و سالم، برش ها در دو ناحیه۱۶۶۴C/T+



شکل۲: قطعه ۲۶۴ جفت بازی محصول هضم آنزیمی *BsrI* برای شناسایی موتاسیون ۱۶۳۷G/A در ژن بتا ۱ اینترلوکین ۱۲.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: قطعه ۲۲۵ جفت بازی محصول هضم آنزیمی *TaiI* برای شناسایی موتاسیون ۱۶۶۴C/T در ژن بتا ۱ اینترلوکین ۱۲.

به صورت هموزیگوت با الگوی برش T/T و در جایگاه ۱۶۳۷G/A+ فاقد برش با الگوی ژنوتیپی G/G بودند. این دو ناحیه در صورت برش خوردن در نتیجه هضم آنزیمی به صورت ۳ نوع ژنوتیپ ;(A/A، G/A، G/G :۱۶۳۷G/A+) و (T/T، C/T ,C/C :۱۶۶۴C/T+) ظاهر می‌شوند. اما تمامی ژنوتیپ‌های به دست آمده در این مطالعه در معادله هاردی ـ واینبرگ سازگاری نداشتند. بین بیماران و افراد سالم هیچ گونه تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد و همگی یک الگوی برش را نشان دادند.

بحث

نواحی مربوط در ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ به عنوان عامل موثر در عفونت‌های شدید مسری مانند سالمونلا و مایکوباکتریوم‌ها گزارش شده‌اند (۳). یک مورد گزارش درباره جهش‌های بی معنی در ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ که موجب سل ریوی در یک کودک شده است، محققان را بر آن داشته که ارتباط بین پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و بیماری سل ریوی برقرار کنند (۴). آکاهوشی و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در توالی کد کننده ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ در جمعیت های ژاپنی و موراکو مرتبط هستند (۵). هوی ت.اس.او و همکاران در سال ۲۰۰۴ یک ارتباط را بین هاپلوتیپ‌های ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و بیماری سل در بین جمعیت هنگ‌کنگ پیشنهاد کردند (۶). همچنین رموس و همکاران در سال ۲۰۰۴ پیشنهاد کردند که در بین افراد بالغ در مراکش پلی مورفیسم‌های رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ خطر ابتلا به بیماری سل ریوی را افزایش می‌دهند (۷). هِی وون لی و همکاران در سال ۲۰۰۵ یک ارتباط بین پلی مورفیسم‌های رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و سل ریوی در جمعیت کره ای گزارش کردند (۸). همچنین کاسوهارا و همکاران در سال ۲۰۰۷ پیشنهاد کردند که یک تنوع ژنتیکی از رسپتور بتا ۱ این سیتوکین تا حدی حساسیت ژنتیکی را نسبت به سل ریوی در ژاپن القا می کند (۹). در بررسی انجام شده توسط امیر زرگر و همکاران در سال ۲۰۰۴که روی ناحیه ۱۱۸۸ـ بررسی شد هیچ گونه ارتباطی با حساسیت به سل ریوی مشاهده نشد (۱۰). نتایج این پژوهش نشان داد که بین نقص در نواحی مورد پژوهش در افراد سالم و بیمار ارتباط معنی داری وجود ندارد. اما برای نتیجه گیری قطعی در این مورد نیاز به انجام مطالعات گسترده‌تری در سایر جمعیت ها وجود دارد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در سایر مطالعات ممکن است در نتیجه تفاوت های نژادی باشد . اما در ایران مطالعات گسترده‌تری برای اثبات دقیق تر ارتباط حقیقی بین پلی مورفیسم‌های ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و بیماری سل ریوی پیشنهاد می‌شود. این مطالعه هرگونه ارتباط بین پلی مورفیسم‌های ژن رسپتور بتا ۱ در نواحی ذکر شده و بیماری سل ریوی را در جمعیت ایرانی رد می‌کند.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی به دلیل حمایت های مالی و اجرایی اعلام می دارند.

References

1. Abul K, Abbas; Andrew-H, Lichtman; Jordan S, Pober, (2000).
2. Cooper AM, Solache A, and Khader SA. Interleukin -12 and tuberculosis : an old story revisited. Curr Immunol. 2007. 19(4):441-447.
3. De Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ, Kabel PJ, Draaisma JM, van Dissel JT, Kroon FP, et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-defi cient patients. Science. 1998; 280: 1435-1438.
4. Altare F, Ensser A, Breiman A, Reichenbach J, Baghdadi JE, Fischer A, Emile JF, Gaillard

www.SID.ir

Archive of SID

JL, Meinl E, Casanova JL. Interleukin-12 receptor beta1 deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. J Infect Dis. 2001. 184: 231-236.

5. Akahoshi M, Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Tanaka Y, Okada K, Otsuka T, Harada M. Influence of interleukin-12 receptor beta 1 polymorphisms on tuberculosis. Hum Genet. 2003. 112:237-243.
6. Tso HW, Lau YL, Tam CM, Wong HS, and Chiang AKS. Associations between IL12B Polymorphisms and Tuberculosis in the Hong Kong Chinese Population. The Journal of Infectious Diseases. 2004. 190:913-919.
7. Remus N, El Baghdadi J, Fieschi C, Feinberg J, Quintin T, Chentoufi M, Schurr E, Benslimane A, Casanova JL, Abel L: Association of IL12RB1 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. J Infect Dis. 2004. 190:580-587.
8. Won Lee H, Seok Lee H, Kyeom Kim D, Seok Ko D, Koo Han S, Shim YS, Yim JJ. Lack of an Association between Interleukin-12 Receptor ?1 Polymorphisms and Tuberculosis in Koreans. Respiration. 2005. 72:365-368.
9. Kusuhara K, Yamamoto K, Okad K, Mizuno Y and Hara T. Association of IL12RB1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese :a gene-based association analysis of 21 candidate genes. International Journal of Immunogenetics. 34:35-44.
10. Amirzargar AA, Rezaei N, Jabbari H, Danesh AA, Khosravi F, Hajabdolbaghi M, Yalda A, Nikbin B. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis, European Cytokine Network. 2006. 17(2):84-9.

www.SID.ir