Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

T-bet and GATA-3 Gene Expression in Children with Allergic Asthma and Healthy Controls

Mostafa Kardan[1],
Javad Ghaffari[2],
Reza Valadan[3],
Alireza Rafiei[4],
Mostafa Soltani[1],
Meysam Aghajani[1],
Marziyeh Mohammadi[5]

[1] MSc Student in Immunology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] PhD student in Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received December 14, 2016 ; Accepted February 28, 2017)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

Abstract

Background and purpose: Allergic asthma is a chronic inflammatory disorder with increased inflammation and bronchial over react to stimulants. Th1 and Th2 cells are the main cells involved in the pathophysiology of asthma. The function of these cells is under the influence of T-bet and GATA3 transcription factors. This study aimed to investigate the impairment of immune responses in patients with allergic asthma compared with controls.

Materials and methods: In a case-control study, 24 patients with allergic asthma and 10 healthy individuals were recruited. The Mononuclear cells (PBMCs) were isolated and cDNA was synthesized after RNA extraction. Gene's expressions of T-bet and GATA3 were evaluated by Real-time Polymerase chain reaction and their relationships with risk factors for asthma were analyzed using statistical tests.

Results: In our study, the GATA3 gene expression in patients increased 29 times more than that in controls (P= 0.002) but the expression of T-bet declined (0.43, P =0.32). Evaluation of T-bet / GATA3 showed that this ratio was significantly lower in patients compared with that in the controls (P<0.0001).

Conclusion: Increased expression of GATA3 and significant reduction of T-bet / GATA3 ratio in patients showed disturbed immune responses in asthma. So, any remedial or control actions should focus on improving the unbalanced situation.

Keywords: allergic asthma, T-bet, GATA-3, Real time PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (146): 9-21 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۶ اسفند سال ۱۳۹۵ (۲۱-۹)

بررسی بیان ژن های T-bet و GATA-3 در کودکان مبتلا به آسم آلرژیک در مقایسه با گروه شاهد

مصطفی کاردان[۱]
جواد غفاری[۲]
رضا ولدان[۳]
علیرضا رفیعی[۴]
مصطفی سلطانی[۱]
میثم آقاجانی[۱]
مرضیه محمدی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: آسم آلرژیک یک اختلال التهابی مزمن است که با افزایش التهاب مجاری هوایی و پاسخ بیش از حد برونش به محرک‌ها می‌باشد. سلول‌های اصلی دخیل در پاتوفیزیولوژی آسم، سلول‌های Th1 و Th2 می‌باشند و عملکرد این سلول‌ها تحت تاثیر فاکتورهای رونویسی T-bet و GATA3 می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی وضعیت بیان ژن‌های T bet، GATA3 در کودکان مبتلا به آسم آلرژیک در مقایسه با گروه شاهد انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش مورد- شاهدی تعداد ۲۴ بیمار مبتلا به آسم آلرژیک و هم‌چنین ۱۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل شرکت داشتند. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی جدا گردید، RNA آن‌ها استخراج و cDNA سنتز شد و بیان نسبی فاکتورهای نسخه برداری T-bet و GATA3 به وسیله روش Real time PCR ارزیابی شد و ارتباط آن با فاکتورهای خطر آسم با استفاده از آزمون‌های آماری مربوطه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان ژن GATA3 در بیماران به میزان ۲۹ برابر افراد شاهد افزایش داشت (p=۰/۰۰۲). در حالی که بیان T-bet کاهش داشته (۰/۴۳) و معنی‌دار نبود (p=۰/۳۲). ارزیابی نسبت T-bet/GATA3 نشان داد که در بیماران این نسبت به‌طور معنی‌داری کمتر از افراد شاهد است (p<۰/۰۰۰۱).

استنتاج: افزایش بیان GATA3 و کاهش نسبت T-bet/GATA3 بیماران در مقایسه با افراد شاهد نشان از اختلال وضعیت پاسخ‌های ایمنی اختصاصی در آسم دارد. بنابراین هر گونه اقدام درمانی و یا کنترلی می‌بایست بر اصلاح وضعیت عدم تعادل ایجاد شده متمرکز گردد.

واژه های کلیدی: آسم آلرژیک، T-bet، GATA3، Real time PCR

مقدمه

آسم آلرژیک یک اختلال التهابی مزمن بوده که با افزایش پاسخ‌دهی مجاری هوایی به انواع محرک‌ها و هم‌چنین افزایش ترشح موکوس مشخص می‌شود و با علائمی مانند عطسه، سرفه و تنگی نفس همراه است(۱).

مولف مسئول: علیرضا رفیعی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص)، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی E-mail: rafiei1710@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استاد، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشجوی دکترای ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تهران علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۹/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۹/۲۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۱۲/۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۴ آسم یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن بوده که تقریبا ۳۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا هستند و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۲۵ به ۴۰۰ میلیون نفر برسد(۲). در میان نژادهای مختلف، آفریقا و آمریکایی‌ها اندکی رتبه بالاتری در بستری شدن و مرگ براثر بیماری آسم نسبت به نژادهای دیگر دارند(۳). بر طبق آمارگیری که در سال ۱۳۸۶ صورت گرفت، میانگین شیوع آسم در ایران ۱۳/۱۴ درصد است که بالاتر از میانگین جهانی است(۴). هم‌چنین در مطالعاتی، شیوع آسم در ایران بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۳ با نرخ ۱۳ درصد بوده که کم‌ترین آن در کرمان(۲/۷درصد) و بیشترین میزان در تهران (۳۵/۳ درصد) گزارش شده است(۵). آلرژن‌هایی مثل گرده، گرد و غبار خانگی، پوست و موی حیوانات خانگی و... از عوامل ایجاد کننده این بیماری هستند. در این بیماری بیش‌تر سلول‌ها و مدیاتورهای سلولی مثل ماست سل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، لنفوسیت‌های T، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، و سلول‌های اپی‌تلیال نقش مهمی را ایفا می‌کنند(۷،۶). سلول‌های +TCD4 از کارگزاران اصلی پاسخ‌های ایمنی در سلامت و در بیماری‌های التهابی هستند که به دستجات سلول‌های Th1, Th2, Th17 و Treg تقسیم می‌شوند. آسم، بیش‌تر یک بیماری وابسته به Th2 است که با ترشح اینترلوکاین‌های(IL)، IL-4، IL-5، IL-9 و IL-13 شناخته می‌شود. این سایتوکاین‌ها مخصوصاً IL-4، IL-5 و IL-13 نقش مهمی در پیشرفت آسم دارند. IL-4، یک سایتوکاین برای تولید ایمونوگلوبولین E (IgE) بوده و IL-5، مسئول تمایز نهایی، فعال شدن و فراخوانی ائوزینوفیل‌ها می‌باشد. هم‌چنین IL-13 باعث افزایش هایپرپلازی سلول‌های گابلت و افزایش ترشح موکوس می‌شود. فاکتور رونویسی GATA3 به عنوان تنظیم‌کننده اساسی تمایز Th2 عمل کرده و بروز ژن‌های سایتوکاین‌های آن را افزایش می‌دهد. به علاوه GATA3 قادر است به واسطه مهار بیان زنجیره پیام‌دهی گیرنده IL-12 ، از تمایز سلول‌های Th1 جلوگیری نماید(۱۱-۸). فاکتور رونویسی T-bet عضوی از خانواده T-box است که در تمایز و عملکرد افکتوری سلول‌های Th1 نقش دارد. از سایتوکاین‌های ترشح شده توسط سلول Th1 می توان به IFN-γ ، IL-12 اشاره کرد که در ایمنی سلولی نقش داشته و در کاهش پاسخ‌های ایمنی سلول Th2 می‌تواند موثر واقع شود(۱۴-۱۲). اخیراً، عدم تعادل بین فاکتورهای رونویسی T-bet و GATA3 در آسم برونشیال مخصوصاً آسم آلرژیک گزارش شده است. در نتیجه تحقیق بر روی نسبت T-bet/GATA3در شرایط مختلف بیماری و مقایسه آن با افراد سالم ممکن است برای فهم اتیولوژی آسم و ایجاد روش‌های ایمونوتراپی مفید باشد(۱۶،۱۵). در این مطالعه ما بیان نسبی فاکتورهای رونویسی T-bet و GATA3 را در بیماران مبتلا به آسم و ارتباط آن با شدت بیماری و هم‌چنین فاکتورهای خطر بیماری را نسبت به افراد سالم مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه

این مطالعه موردی شاهدی در تعداد ۳۴ نفر انجام شد که پس از اطلاع از پروتکل و اهداف مطالعه به‌صورت داوطلبانه وارد مطالعه شدند. این تعداد شامل ۲۴ نفر بیمار مبتلا به آسم آلرژیک به فرم‌های خفیف (۷ نفر)، متوسط (۱۱ نفر) و شدید (۶ نفر) و همچنین ۱۰ نفر فرد سالم به عنوان کنترل بود که بیماران و افراد کنترل از نظر سن و جنسیت مشابه‌سازی شدند. ابتلا به آسم آلرژیک بر اساس آخرین معیارهای تشخیصی انجمن آسم آمریکا (GINA،۲۰۱۵) و توسط پزشک فوق تخصص آسم و آلرژی تشخیص داده شد. به طوری که افراد مبتلا دارای معیارهای ورودی شامل یافته‌های بالینی و پاراکلنیکی (اسپیرومتری، سنجش IgE) ابتلا به آسم بودند. عمده این افراد بیمارانی بودند که به تازگی ابتلا به آسم آن‌ها تشخیص داده شده بود. افراد مبتلا فاقد بیماری‌های زمینه‌ای از جمله دیابت، فشارخون،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

بیماری‌های انسدادی مجاری هوایی نظیر COPD، عفونت ویروسی یا باکتریایی بودند و دارویی به غیر از داروهای مورد نظر در آسم، مصرف نمی‌کردند. بیماران بر اساس شدت بیماری آسم به سه گروه خفیف، متوسط و شدید طبقه‌بندی شدند. در این مطالعه همچنین تعداد ۱۰ نفر فرد سالم که از لحاظ بالینی و آزمایشگاهی فاقد علامت آسم و هرگونه بیماری زمینه‌ای اعم از بیماری‌های آلرژیک یا سایر موارد اتوپی، خود ایمنی و عفونی بودند که سلامت این افراد نیز توسط آزمایشات پاراکلنیکی و یافته‌های اسپیرومتری مورد تایید پزشک متخصص قرار گرفت، به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. پروتکل این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تصویب شده و ورود به مطالعه براساس معیارهای توافق شده هیلسنکی بوده که جمعیت مورد مطالعه با رضایت آگاهانه وارد مطالعه شدند.

نمونه‌گیری و جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)

پس از اخذ رضایت کتبی از افراد مورد مطالعه یا والدین آن‌ها، میزان ۱۰-۵ میلی‌لیتر خون محیطی در شرایط آرامش (فاقد حملات آسم) از بیماران و همچنین افراد کنترل در کلینیک تخصصی طوبی و بیمارستان بوعلی ساری اخذ و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (۵۰ میلی‌مولار) ریخته شد و با حفظ و رعایت شرایط زنجیره‌ای سرد در cool box قرار داده و در نهایت به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی ساری انتقال داده شد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) با استفاده از شیب غلظتی فایکول ۱/۰۷۷جداسازی گردید. برای این منظور فایکول ۱/۰۷۷را به میزان نصف حجم نمونه خون به لوله فالکون ۱۵ ml انتقال داده و خون کامل (Whole blood)توسط پیپت پاستور به آرامی در سطح آن اضافه گردید. سپس در دور ۴۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، سانتریفوژ شد و حلقه PBMCs به آرامی برداشته شده و برای حذف اثرات توکسیک فایکول، سلول‌های اخذ شده سه بار با PBS با سانتریفوژ در دور ۲۵۰g به مدت ۱۰ دقیقه، شستشو داده شد. سپس برای متناسب ساختن تعداد جمعیت سلولی در هر نمونه، سلول‌های PBMCs جدا شده را با RPMI1640 به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از لام نئوبار تعداد سلول‌ها شمارش گردید و در تعداد ۴ میلیون سلول تنظیم گردید.

استخراج RNA و بررسی خلوص و کیفیت آن

در این مطالعه برای استخراج RNA از کیت ستونی شرکت سیناژن (سیناژن، ایران) استفاده شد. اساس استخراج RNA توسط این کیت به‌صورت اتصال RNA به غشائ سیلیکایی فیلتر داخل ستون استخراج در حضور غلظت بالای نمک است و هم‌چنین در شرایط نمک پایین (آب دیونیزه فاقد RNase)، RNA متصل شده از فیلتر جدا می‌شود. بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، وارد نمودن تعداد ۴ تا ۶ میلیون سلول در هر ستون، نتیجه مناسبی از نظر مقدار RNA به دنبال خواهد داشت. پس از انجام مراحل استخراج، RNA با افزودن مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر بافر آزادکننده، از ستون آزاد شده و در میکروتیوپ استریل فاقد RNase و DNase جمع گردید. با توجه به اهمیت حفظ یکپارچگی RNA در مراحل بعدی، علاوه بر برآورد کمیت RNA می‌بایست کیفیت و خلوص RNA به دست آمده نیز بررسی و ارزیابی شود. مقدار RNA به دست آمده با استفاده از دستگاه نانواسپکتومتر و فتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شده و پس از محاسبه نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ (OD260/OD280) با استفاده از فرمول زیر به دست آمد.

مقدار RNA = OD260/OD280 × ۴۰ × ضریب رقت

مقدار RNA بر حسب µg/ml برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، از الکتروفورز اندکی از نمونه RNA

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

در ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد که دو باند ۲۸s و ۱۸s به خوبی در شکل ژل حاوی سایبر سیف مشاهده شد.

سنتز cDNA

سنتز cDNA بااستفاده ازکیت پارس طوس صورت گرفت که حاوی ترکیبات RT oligo(dT), و Random Hexamer می‌باشد. محلول RT محتوی آنزیم MMLV RTase بوده که در افزایش سنتز cDNA و پایداری آن نقش دارد. طبق پروتکل کیت، در شرایط کاملا استریل ترکیبات لازم برای سنتز cDNA به RNA اضافه گردید و در شرایط دمایی: ۲۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۷ °C به مدت ۶۰ دقیقه، و ۷۰°C به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه BioRad مراحل تکمیلی سنتز cDNA صورت پذیرفت. برای بررسی کیفیت cDNA سنتز شده، از الکتروفور آن در ژل آکارز ۲درصد استفاده گردید.

بررسی بیان ژن توسط Real-Time PCR

تکنیک Real-Time PCR روشی است که طی آن تکثیر محصولات PCR و سنجش آن‌ها همزمان صورت می‌گیرد. در این تکنیک می‌توان در هر لحظه از زمان و در هر سیکل مقدار DNA تکثیر شده را اندازه‌گیری کرد. در این روش برای نمایش تکثیر به جای اتیدیوم بروماید از مواد فلور سانتی مانند SYBR Green که حساسیت بیش‌تری دارد استفاده می‌شود. در طول واکنش، میزان فلورسانس متناسب با میزان محصولات تکثیر شده در هر سیکل تغییر می‌یابد. در مطالعه حاضر واکنش Real-Tim PCR توسط دستگاه Bio-Rad ساخت کشور آمریکا طبق پروتکل دمایی مندرج در جدول شماره ۱ انجام گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Relative Quantitative Real-time PCR، داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. در این مطالعه برای نرمال‌سازی میزان بیان ژن‌های هدف، از ژن رفرانس EF-1 استفاده شد که یک ژن خانه بان می‌باشد که بیان آن در شرایط مختلف تیماری تغییری نمی‌کند. برای بررسی بیان نسبی mRNA ژن‌های هدف از روش ابداعی لیواک استفاده شد که در این روش به جای Ct که اعدادی توانی هستند که از نمودار لگاریتمی- خطی تکثیر ژنی به دست می آید از 2-ΔΔCt استفاده می‌شود که دامنه خطی دارد. هم‌چنین برای به دست آوردن میزان کارایی (Efficiency) تکثیر هر یک از ژن‌های مورد نظر منحنی تکثیر با استفاده از ۶ رقت بر مبنی ۱۰ از cDNA به دست آمد و شیب منحنی با استفاده از Ct هر رقت در لگاریتم غلظت cDNA به دست آمد. همچنین Efficiency تکثیر هر ژن به دست آمد که چون Efficiency ژن های هدف (GATA-3 و T-bet) خیلی نزدیک با EF-1 بود از روش 2-ΔΔCt برای محاسبه بیان نسبی ژن‌های هدف استفاده شد.

پرایمر GATA-3 accession number:NM- (00100229). توسط نرم افزار AlleleID نسخه ۷/۵ شرکت premier biosoft طراحی شد به‌طوری‌که mRNA به صورت تخصصی تکثیر شود نه DNA ژنومی. همچنین توالی ژنی T-bet(۱۷) و EF-1(۱۸) از مقالات معتبر به دست آمد.

آنالیز آماری

داده‌های کیفی به صورت فراوانی مطلق و نسبی بیان شدند و برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون کای دو استفاده شد. داده‌های کمی به صورت میانگین ± SD و یا میانه نمایش داده شده‌اند. برای مقایسه داده‌های

جدول شماره۱: توالی پرایمر مورد استفاده و پروتکل دمایی در Real Time PCR

ژن	پرایمر	توالی	اندازه محصول (bp)	پروتکل دمایی
EF-1	Forward Reverse	CTGAACCATCCAGGCCAAAT GCCGTGTGGCAATCCAAT	۵۹	۹۵°C-۳۰ثانیه
T-bet	Forward Reverse	GATGCGCCAGGAAGTTTCAT GCACAATCATCTGGGTCACATT	۸۳	۹۵°C-۱۵ثانیه
GATA-3	Forward Reverse	GTCCTGTGCGAACTGTCA GATGCCTTCCTTCTTCATAGTCA	۱۳۹	۶۰°C-۳۰ثانیه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

کمی، ابتدا توزیع آن‌ها با استفاده از تست کلموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. برای مقایسه داده‌های کمی در صورت داشتن توزیع نرمال از آزمون t student و یا ANOVA و چنان چه توزیع نرمال نباشد از آزمون‌های ناپارامتری نظیر Mann-Whiteny U test و یا Kruskal-Wallis H استفاده شد. در تمام آنالیزهای آماری سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ (p<۰/۰۵) در نظر گرفته شد. برای انجام تجزیه و تحلیل آماری از سامانه SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه تعداد کل ۳۴ نفر مورد مطالعه قرار گرفتند که از این تعداد ۲۴ نفر بیمار مبتلا به بیماری آسم آلرژیک و ۱۰ نفر فرد سالم بودند. جدول شماره ۲ بر اساس ویژگی‌های دموگرافیک و بالینی گروه بیمار و سالم تنظیم شده است، با توجه به این‌که تعداد نمونه از نظر آماری قابل توجیه می‌باشد و همچنین توزیع داده‌ها نیز از پراکندگی نرمال و مناسب برقرار بود لذا تجزیه و تحلیل، بر حسب متغیرهای مورد نظر از جمله سن و جنس و سایر موارد انجام گردید.طبق جدول فوق سن بیماران مبتلا به آسم (۱۲/۴۶±۷/۹) بوده ،گرچه از سن افراد شاهد کم‌تر می‌باشد (۱۵/۱±۷/۷) ولی ارزیابی آماری نشان دادکه اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود ندارد (p=۰/۳۷۹). هم‌چنین اکثرافراد بیمار مرد بودند (۵۴/۲) و درجمعیت سالم نیز مردان بیش‌تر از زنان وارد مطالعه شدند و ارزیابی آماری نشان داد که بین جنسیت در دوگروه افراد بیمار و سالم تفاوتی وجود ندارد (p=۰/۵۲۹). هم‌چنین برای بررسی وضعیت آلرژیک بیماران، میزان ائوزینوفیلی خون محیطی در دو جمعیت مورد ارزیابی قرار گرفت که در بیماران آسمی تعداد ائوزینوفیل‌ها به طور کاملاً معنی‌داری از افراد سالم بیش‌تر بود (p=۰/۰۰۸). باتوجه به این‌که سابقه خانوادگی آسم می‌تواند به‌عنوان یک ریسک فاکتور تاثیرگذار در ارزیابی‌های بعدی باشد لذا این وضعیت در بین دو گروه افراد بیمار و سالم مورد ارزیابی قرار گرفت که نشان داد تفاوت معنی‌داری بین وجود سابقه خانوادگی ابتلا به بیماری آسم در بیماران نسبت به افراد سالم وجود دارد (p=۰/۰۰۵). هم‌چنین بررسی عملکرد ریه با استفاده از تست‌های اسپیرومتری در خصوص دو جمعیت بیمار و سالم انجام گرفت که نشان داد بیماران مبتلا به آسم از نظر درصد FEV1 به‌طور معنی‌داری کم‌تر از افراد سالم بودند (p=۰/۰۲۴).

جدول شماره۲: مقایسه ویژگی‌های دموگرافیک و بالینی گروه بیمار و سالم

خصوصیات	افراد سالم	بیماران آسمی	سطح معنی داری
سن(سال)	۱۵/۱ ± ۷/۷	۱۲/۴۶ ±۷/۹	۰/۳۷۹
جنس			
مرد تعداد (درصد)	(۶۰)۶	(۵۴/۲)۱۳	۰/۵۲۹
زن تعداد (درصد)	(۴۰)۴	(۴۵/۸)۱۱	
ائوزینوفیل (تعداد/میکرولیتر)	۲۱۹/ ± ۶۶/۹	۸۲۹/۱ ± ۶۶۶/۹	۰/۰۰۸
سابقه خانوادگی- تعداد	(۱۰)۱	(۶)۲۴	۰/۰۰۵
FEV1-(درصد)	(۹۹-۱۰۳)۱۰۱	(۴۵-۸۲)۶۰/۴۷	۰/۰۲۴
FVC-(درصد)	(۹۴-۹۸)۹۶	(۵۵-۹۹)۷۹	۰/۰۳۸

در این مطالعه بیماران مبتلا به آسم بر اساس معیارهای GINA به سه فرم خفیف،متوسط و شدید تقسیم شدند و ریسک فاکتورهای مختلف دراین سه گروه مقایسه گردید.

طبق جدول شماره۳، ارتباط ریسک فاکتورهای بیماری آسم با شدت بیماری مورد بررسی قرار گرفته که نشان می‌دهد از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در سن بیماران، بین سه گروه مشاهده نشد (p=۰/۳۷). گرچه سابقه خانوادگی در بیماران مبتلا به آسم خفیف بیش‌تر از دو گروه دیگر بود اما از لحاظ آماری معنی‌دار نشد (p=۰/۴۳). هم‌چنین در ارزیابی شاخص‌های اسپیرومتری، درصد FEV1 و FVC در افراد آسمی با افزایش شدت، بیماری کاهش می‌یابد به‌طوری که سطح کاهش بین گروه بیمار ازلحاظ آماری معنی‌دار شد (p<۰/۰۰۰۱). هم‌چنین ارزیابی نسبت FEV1/FVC نشان داد که میزان گرفتگی مجاری تنفسی درافراد مبتلا به آسم شدید به طور محسوسی از بیماران مبتلا به آسم خفیف و متوسط بیشتر است، که این تفاوت از لحاظ

www.SID.ir

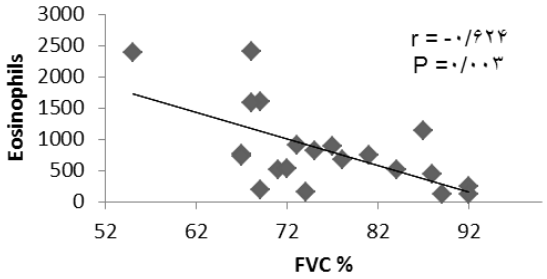
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

آماری معنی‌دار بود(p=۰/۰۰۵). نمودار شماره۱ براساس ارتباط ائوزینوفیل بیماران با شاخص FVC تنظیم شده است که نشان می‌دهد ضریب همبستگی منفی بین مقدار ائوزینوفیل در خون محیطی بیماران و FVC آن ها دیده می‌شود. به این صورت که با افزایش مقدار ائوزینوفیل، مقدار FVC کاهش می‌یابد که از لحاظ آماری نیز معنی دار بود(p=۰/۰۰۳). (نمودار شماره۱).

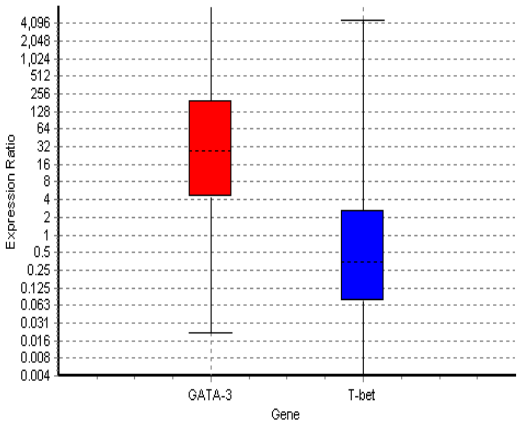
جدول شماره ۳: مقایسه ویژگی‌های دموگرافیک و بالینی براساس شدت بیماری

شدت	شدید	متوسط	خفیف	سطح معنی داری
سن	۱۶/۵ ± ۱۲/۳	۱۱/۰± ۴/۷	۱۱/۲۹± ۷/۵	۰/۳۷
جنس (مرد/زن)	۳:۳	۴:۷	۴:۳	۰/۶۷
سابقه خانوادگی تعداد(درصد)	۱ (۱۶/۷)	۲ (۱۸/۲)	۳ (۴۲/۹)	۰/۴۳۱
طول دوره بیماری	۷/۰ ± ۱۰/۴	۴/۴۱ ± ۳/۲	۵/۷۹ ± ۲/۲	۰/۶۵۳
FEV1 (درصد)	۵۰/۳ (۴۵-۵۳)	۶۰ (۵۳-۷۴)	۷۵/۲ (۶۱-۸۲)	<۰/۰۰۰۱
FVC (درصد)	۶۵/۸ (۵۵-۷۷)	۸۰/۷ (۷۴-۸۸)	۸۹/۷ (۸۱-۱۰۰)	<۰/۰۰۰۱
ائوزینوفیل(تعداد/میکرولیتر)	۷۴۳/۶۷ ± ۵۴۱/۳	۹۳۳/۲ ± ۷۴۸/۷	۷۸۳/۴ ±۴۶۳/۳	۰/۸۶۲



نمودار شماره۱: ارتباط میزان ائوزینوفیلی بیماران با درصد FVC

به منظور ارزیابی الگوی پاسخ‌های ایمنی اختصاصی در جمعیت مورد مطالعه، دو فاکتور نسخه‌برداری کلیدی که بازگوکننده نوع پاسخ‌های TH1 (Tbet) و TH2 (GATA3) می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که نمودار شماره ۲ نشان می‌دهد بیان ژن GATA3 در بیماران مبتلا به آسم به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت به‌طوری که در مقایسه با افراد سالم ۲۹/۷۳ برابر افزایش بیان دارد و این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۲). حال آن‌که، ارزیابی بیان Tbet در PBMC بیماران مبتلا به آسم در مقایسه با افراد سالم نشان داد گرچه بیان Tbet درافراد آسمی کاهش یافته (۰/۴۳۵) اما این کاهش قابل ملاحظه نبوده و این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نشد (p=۰/۳۲).



نمودار شماره۲: بیان ژن Tbet و GATA3در بیماران نسبت به افراد سالم

هم‌چنین به منظور بررسی تاثیر ریسک فاکتورهای مختلف این بیماری درجهت دادن پاسخ‌های ایمنی در بیماران مبتلا به آسم وضعیت بیان فاکتورهای نسخه‌برداری Tbet و GATA3 مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این‌که سن می‌تواند در بروز بیماری نقش موثر داشته باشد، متغیر سن به دو دسته کم‌تر از ۱۲ سال (اطفال) و برابر یا بیش‌تر از ۱۲ سال (نوجوانان) تقسیم‌بندی شد. همان‌طورکه جدول شماره ۴ نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری در بیان فاکتورهای نسخه برداری Tbet و GATA3 براساس سن بیماران مشاهده نشد (p >۰/۰۵).

هم‌چنین جنسیت نیز تاثیر چندانی در وضعیت بیان این فاکتورهای نسخه‌برداری نداشت. با توجه به این که

جدول شماره ۴: ارتباط ریسک فاکتور های بیماری با بیان ژن های Tbet و GATA3

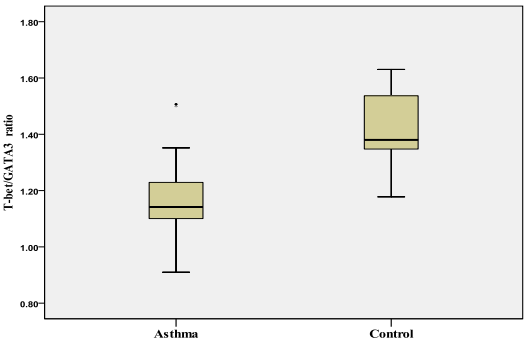
متغیر	سن		سطح معنی داری	جنس		سطح معنی داری	سابقه خانوادگی		سطح معنی داری
	<۱۲ سال	≥۱۲ سال		مرد	زن		دارد	ندارد	
GATA3	۱۱/۰ ±۴/۱	۱۱/۷۲ ±۳/۷	۰/۶۶۳	۱۰/۹۵ ±۴/۲	۱۱/۶۵ ±۳/۵	۰/۶۶۸	۱۰/۶۵±۵/۰۳	۱۱/۵ ± ۳/۵	۰/۶۲۸
T-bet	۷/۳ ±۲/۷	۷/۳۸ ±۱/۹	۰/۹۶۵	۶/۹۹ ±۲/۸	۷/۷۸ ±۱/۹	۰/۴۳۶	۸/۴۲ ±۲/۸	۷/۰ ± ۲/۳	۰/۲۱۷

www.SID.ir

Archive of SID

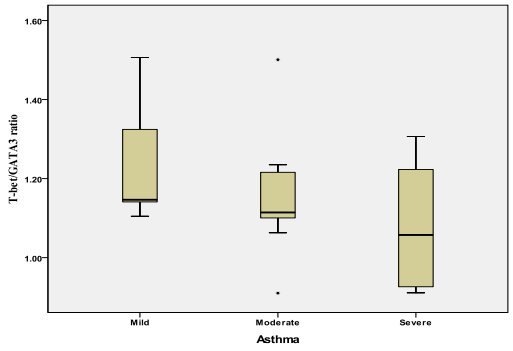
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

تعداد سلول‌های بیان‌کننده این فاکتورهای نسخه‌برداری می‌تواند بین جمعیت مورد مطالعه متفاوت باشد لذا برای حذف این تغییرات مداخله گر و هم‌چنین برای مشاهده بهتر تغییرات پاسخ‌هایTH1/TH2، نسبت بیانTbet/GATA3 محاسبه و بین دو جمعیت ارزیابی گردید. همان‌طور که نمودار شماره ۳ نشان می‌دهد، نسبت Tbet/GATA در بیماران مبتلا به آسم (۱/۱۶±۰/۱۵) در مقایسه با افراد سالم (۱/۴۱±۰/۱۴) کاهش معنی‌داری داشته است که این کاهش ناشی از تغییرات افزایش GATA3 در بیماران مبتلا به آسم می باشد که به میزان بسیار بالایی (۲۹/۷۳ برابر) افزایش دارد (p<۰/۰۰۰۱) (نمودارشماره۳).



نمودار شماره۳: مقایسه نسبت بیان ژن Tbet/GATA3 بین گروه بیمار و سالم

هم‌چنین در ارزیابی شدت بیماری آسم در میزان بیان Tbet/GATA3 نشان داد گرچه در بیماران مبتلا به آسم خفیف این نسبت (۱/۲۴ ± ۰/۱۵) بیش‌تر از گروه متوسط (۱/۱۶ ±۰/۱۴) و شدید (۱/۰۸ ±۰/۱۶) می‌باشد ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نشد (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: مقایسه نسبت Tbet/GATA3 بر اساس شدت بیماری

بحث

این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن فاکتور نسخه‌برداری GATA3 در افراد مبتلا به آسم آلرژیک در مقایسه با افراد سالم به‌طور معنی‌داری بیش‌تر است در حالی که بیان T-bet گرچه نسبت به افراد سالم کاهش یافته بود ولی این کاهش قابل ملاحظه نبود. با توجه به این‌که فاکتور نسخه‌برداری GATA3 و T-bet به‌ترتیب نماینده پاسخ‌های نوع دو Th2 و Th1 می‌باشند، افزایش بیان GATA3 و عدم افزایش معنی‌دار T-bet نشانگر انحراف پاسخ‌های ایمنی به سمت Th2 می‌باشد. این استنتاج به ویژه زمانی نمود کامل تر یافت که نسبت سلول‌های Th1/Th2 که با T-bet/GATA3بیان می‌شود، در بیماران مبتلا به آسم با افراد سالم مقایسه شد. نسبت بیان T-bet/GATA3 در افراد بیمار به میزان قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر از افراد سالم بوده است. آسم آلرژیک بیماری پیچیده و هتروژنی است که از مشخصات آن می‌توان به التهاب و انقباض برگشت‌پذیر مجاری هوایی، افزایش حساسیت برونش و ارتشاح لنفوسیت و ائوزینوفیل اشاره کرد که لنفوسیت‌های T، ائوزینوفیل‌ها و ماست سل‌ها نقش مهمی در این بیماری دارند(۱۹). عوامل محیطی و ژنتیکی بر شدت پاسخ آسم تاثیر می‌گذارند و فاکتورهایی هم‌چون ویروس‌ها، آلرژن‌ها و تماس‌های شغلی می‌توانند تغییر دهنده سیر بیماری باشند(۱۲). سابقه خانوادگی آسم می‌تواند به عنوان یکی از عوامل خطر در بروز بیماری محسوب شود. همان‌طور که از لحاظ آماری در جمعیت حاضر نشان می‌دهد افراد با سابقه خانوادگی آسم استعداد بیش‌تری در بروز بیماری نسبت به افراد سالم دارند که هم راستا با مطالعات دیگر صورت گرفته می‌باشد(۲۰). طبق بررسی انجام شده در جمعیت مورد مطالعه ی حاضر ارتباط معنی‌داری بین سن و جنس با بروز بیماری دیده نشد. اگر چه نسبت شیوع بیماری در مردان کمی بیش‌تر از زنان بود.ناگفته نماند سن می‌تواند به عنوان یک متغیر در میزان شیوع بیماری در جنس مرد یا زن تاثیرگذار باشد. به طور مثال

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

Dan و همکارانش به این نتیجه دست یافتند که در میانگین سنی ۴ تا۱۲ سال در مقایسه با افراد بالغ، شیوع بیماری آسم در کودکان پسر بیش‌تر از دختران بوده است(۲۰). نتایج مطالعات حاکی از آن است که با افزایش سن، شیوع بیماری به سمت زنان شیفت پیدا می‌کند که یکی از عوامل مهم تاثیرگذار در افزایش شیوع بیماری آسم در زنان می‌تواند به دلیل افزایش در ترشح استروژن و پروژسترون بعد از سن بلوغ باشد که افزایش در این هورمون‌ها می‌تواند سبب شیفت پاسخ ایمنی به سمت Th2 و هم‌چنین افزایش ترشح IL-4 وIL-13 و افزایش فعالیت ائوزینوفیل ها شده که تمامی این عوامل ریسک بروز بیماری را برای افرادی که مستعد بیماری آسم هستند بالا می‌برد(۲۱). از آن‌جایی که در مطالعه حاضر میانگین سنی بیماران پایین‌تر از سن بلوغ می باشد افزایش ناچیز شیوع بیماری در جنس مذکر قابل توجیه می‌باشد. همچنین در طبقه بندی آسم براساس شدت بیماری نشان داد که گرایش سنی خاصی در خصوص تشدید علائم آسم و هم‌چنین وخامت وضعیت تنفسی بیماران دیده نمی‌شود که این امر ناشی از توزیع سنی بیماران این مطالعه می‌باشد که عمدتا شامل اطفال و نوجوانان با میانگین سنی ۱۵ سال بوده است. هم‌چنین در این مطالعه شاهد افزایش معنادار ائوزینوفیل در خون بیماران در مقایسه باافراد سالم بودیم. گفتنی است که افزایش سطح ائوزینوفیل منحصر به آسم آلرژیک نبوده بلکه در نوع غیرآلرژیک نیز می‌تواند رخ دهد. همچنین طی مطالعاتی،کاهش پاسخ به داروهای کورتیکو استروئیدی استنشاقی دربیماران مبتلا به آسم آلرژیک دیده شده که این راه درمانی به خوبی توانایی کاهش سطح ائوزینوفیل و سایتوکاین‌های التهابی و درنهایت کنترل بیماری را نداشته است(۲۲). با توجه به این‌که عمده بیماران مورد بررسی در این مطالعه افرادی بودند که تازگی بیماری آسم در آن‌ها توسط پزشک معالج تشخیص داده شده بود و اقدامات درمانی در آن‌ها صورت نگرفته بود لذا تفاوت های دیده شده در سطح ائوزینوفیل‌ها و بیان ژن‌های مورد بررسی، ناشی از ماهیت بیماری بوده است نه این‌که تابع اقدامات درمانی باشد. نتایج برخی مطالعات نشان می دهد که آسم ائوزینوفیلی تقریبا می‌تواند با کاهش سطح FEV1 مرتبط باشد(۲۳). این امر می‌تواند ناشی از افزایش ائوزینوفیل‌ها در این بیماری باشد که مشخص شده است فعالیت ائوزینوفیل‌ها که با تخلیه گرانول‌ها همراه است، منجر به آزادسازی پروتئین بازی اصلی، پروتئین کاتیونیک و پراکسیداز می‌شود که این مواد توکسیک می‌توانند سلول‌های اپی‌تلیال مجاری هوایی را آسیب زده و باعث اختلال در جریان نقل و انتقالات هوای تنفسی گردند. به همین لحاظ حجم تخلیه تنفسی در بیماران مبتلا به آسم در مقایسه با گروه کنترل کاهش محسوسی می‌یابد(۲۵،۲۴).

طی مطالعه حاضر نیز شاهد کاهش معنادار سطح شاخص‌های اسپیرومتری (FEV1,FVC) در بیماران نسبت به افراد سالم بودیم. همان‌طور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش تعداد ائوزینوفیل‌های خون محیطی بیماران، از مقدار FVC کاسته شده و همبستگی منفی بین این دو پارامتر وجود دارد (r=-۰/۶۲۴).که این یافته‌ها هم راستا با مطالعات دیگر صورت گرفته بود(۲۶). مطالعه حاضر مشخص نمود که میزان بیان فاکتور نسخه برداری GATA3 در افراد مبتلا به آسم بیش‌تر از افراد سالم می‌باشد. از سوی دیگر در مقایسه نسبت بیان ژن‌های GATA3 و T-bet با یکدیگر کاهش نسبت T-bet / GATA-3 در گروه بیمار نسبت به افراد سالم مشاهده شد که این نسبت خود گویای افزایش بیان ژن GATA-3 در بیماران نسبت به افراد سالم می‌باشد. این یافته با نتایج مطالعات قبلی صورت گرفته در رابطه با بیماری آسم، هم راستا بوده است(۲۵).

اما در مطالعه‌ای که Min Zhu و همکارانش در سال۲۰۱۶برای تعیین میزان بالانس Th1/Th2/Th17 در افراد مبتلا به آسم واجد و فاقد علایم روانی (افسردگی. استرس و...) مورد بررسی قرار دادند، با سنجش میزان بیان ژن‌های T-bet،GATA-3 و ROR c به همراه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

سایتوکاین‌های IL-17A، TNF و INFγ به این نتیجه دست یافتند که همه متغیرها در افراد مبتلا به آسم به همراه علایم، نسبت به افراد سالم افزایش می‌یابد. ولی در مورد افراد آسمی بدون علایم روانی در مورد Tbet افزایشی دیده نشد(۲۷). افزایش T-bet در گروه واجد علائم روانی متفاوت با نتایج مطالعه حاضر می باشد. یافته های برخی مطالعات نشان داده که در فرم شدید بیماری، نقش سلول‌های Th1 در بیماری زایی بیش‌تر دیده می‌شود(۲۸). از آن‌جایی که در مطالعه حاضر تعداد جمعیت بیماران اغلب از نوع خفیف و متوسط بودند لذا افزایشی در بیان ژن T-bet که بیانگر جمعیت سلول Th1 می‌باشد، دیده نشد. هم‌چنین می‌توان نقش بیماری‌های مرتبط را از نگاه اتیولوژی نیز مورد بررسی قرارداد. بیماری افسردگی خود به عنوان یکی از بیماری‌های مرتبط با آسم بوده و شاید به عنوان یک ریسک فاکتور توانایی تغییر و یا تشدید بیماری را به همراه داشته باشد. هم‌چنین یکی از محاسن مطالعه حاضر تقسیم بندی بیماران بر اساس شدت بیماری بود که افراد در سه گروه خفیف، متوسط و شدید جای گرفتند. طبق این تقسیم بندی ارتباط مستقیمی بین شدت بیماری با بیان ژن GATA-3 دیده شد. به‌طوری که با افزایش شدت بیماری بیان ژن مذکور نیز افزایش یافت که خود می‌تواند شاهدی بر تصدیق تاثیر این ژن در آسیب شناسی بیماری آسم باشد. نا گفته نماند این تغییرات درمورد بیان ژن T-bet خیلی اندک بود به طوری که با افزایش شدت بیماری بیان آن به مقدار ناچیزی کاهش یافت. مطالعات متعددی در زمینه آسم آلرژیک صورت گرفته که می تواند با مطالعه حاضر هم راستا باشد. به عنوان مثال نتایج حاصل از مطالعه ی Jun Sik Lee و همکاران نشان دادند که میزان بیان دو ژن T-bet و GATA-3 در بافت ریه موش های مبتلا به آسم افزایش می‌یابد(۲۹). هم‌چنین You Lu و همکاران مشخص کردند که میزان بیان T-bet وGATA-3 در سلول‌های CD4+ CD25+وCD4+ CD25- بافت ریه موش افزایش دارد(۳۰). DONG Liang و همکاران با استفاده از تکنیک RT-PCR در بیماران مبتلا به آسم نشان دادند که سطح IL-4 در این بیماران افزایش اما سطح IFN-γ و نسبت T-bet/GATA-3 نیز در این بیماران کاهش یافته است(۳۱). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط YONG و همکارانش انجام شد از بیماران مبتلا به آسم آلرژیک و تکنیک RT-PCR استفاده کردند و نتایج آن ها نیز نشان داد که نسبت T-bet/GATA-3 در این بیماران کاهش یافته است(۳۲) تمامی این مطالعات تایید کننده نقش مهم و غیر قابل چشم پوشی دو فاکتور رونویسی GATA3 و T-bet و نسبت این دو در بیماران مبتلا به آسم می‌باشند. افزایش یا کاهش بیان این دو فاکتور رونویسی که بیان کننده افزایش یا کاهش سلول‌های Th2 و Th1 هستند، نسبت این سلول‌ها را در داخل بدن دستخوش تغییر می کنند. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نسبت سلول‌های Th2 به Th1 در بیماران آسمی به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. این تغییرات با افزایش سایتوکاین‌های IL-4 و IL-13 و هم‌چنین افزایش آنتی‌بادی‌های تاثیر پذیر از سلول‌های Th-2 و تشدیدکننده آسم از جمله IgE همراه است. از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به تعداد کم نمونه‌ها، به ویژه در خصوص وضعیت شدت بیماری اشاره کرد. برای کاهش اثرات این محدودیت در برآورد نتایج بررسی پارامترهای مورد نظر اقدامات زیر انجام شد. ۱- از هر نمونه RNA دو بار سنتز cDNA صورت گرفت ۲- اندازه‌گیری بیان ژن‌ها برای هر نمونه cDNA با سه بار تکرار صورت گرفته و میانگین آن‌ها محاسبه گردید. لذا داده‌های به دست آمده از هر نمونه واجد تداوم و همنواختی قابل قبولی می‌باشد. از محدودیت‌های دیگر می‌توان به تاثیر دارو های مصرفی توسط بیماران در بیان ژن‌های مورد بررسی دراین مطالعه ذکر کرد. با توجه به این‌که قطع دارو عملاً از لحاظ اخلاقی برای بیماران مبتلا به فرم متوسط و شدید امکان‌پذیر نمی‌باشد لذا شاید یکی از دلایل عدم وجود

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

تفاوت در بیان ژن‌های فوق در بیماران مبتلا به آسم خفیف، متوسط و شدید ناشی از پیش زمینه استفاده از داروهای تضعیف‌کننده فعالیت سیستم ایمنی باشد به‌طوری‌که در تحقیق انجام شده توسط محققین منجر شد که داروی بدوسوناید که یک کورتیکواستروئید می‌باشد، به میزان زیادی باعث کاهش بیان ژن های فاکتورهای نسخه‌برداری گردید (داده های منتشر نشده محققین) (۳۳). در مجموع می‌توان گفت افزایش بیان GATA3 و کاهش چشمگیر نسبت T-bet/GATA3 در بیماران مبتلا به آسم در مقایسه با افراد شاهد نشان از اختلال وضعیت پاسخ های ایمنی اختصاصی در آسم دارد . بنابراین می‌توان گفت که هر گونه اقدام درمانی و یا کنترلی می‌بایست بر اصلاح وضعیت نامتعادل یا اختلال ایمنی ایجاد شده متمرکز گردد(۳۳).

سپاسگزاری

از پرسنل محترم بخش اطفال و هم‌چنین آزمایشگاه بیمارستان‌های بوعلی و طوبی ساری تشکر می‌گردد. هم‌چنین ازحمایت مالی و معنوی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران از این پروژه تقدیر می‌شود. این پژوهش بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای مصطفی کاردان می‌باشد.

References

1. Watson RR, Zibadi S, Rafatpanah H, Jabbari F, Ghasemi R, Ghafari J, et al. Oral administration of the purple passion fruit peel extract reduces wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. Nutr Res 2008; 28(3): 166-171.
2. Zhou W, Nie X. Afzelin attenuates asthma phenotypes by downregulation of GATA3 in a murine model of asthma. Mol Med Rep 2015; 12(1): 71-76.
3. Singh BB, Khorsan R, Vinjamury SP, Der-Martirosian C, Kizhakkeveettil A, Anderson TM. Herbal treatments of asthma: a systematic review. J Asthma 2007; 44(9): 685-698.
4. Ghaffari J, Rafatpanah H, Khalilian A, Nazari Z, Ghaffari R. Skin Prick Test In Asthmatic, Allergic Rhinitis And Urticaria Patients. Med J Mashhad Univ Med Sci 2011; 54(1): 44-49 (Persian).
5. Ghaffari J, Aarabi M. The prevalence of pediatric asthma in the Islamic Republic of Iran: A systematic review and meta-analysis. J Pediatr Rev 2013; 1(1): 2-11 (Persian).
6. Leigh R, Ellis R, Wattie JN, Hirota JA, Matthaei KI, Foster PS, et al. Type 2 cytokines in the pathogenesis of sustained airway dysfunction and airway remodeling in mice. Am J Respir Crit Care Med 2004; 169(7): 860-867.
7. Zhao Y, Yang J, Gao Y-d, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. Int Arch Allergy Immunol 2009;151(4):297-307.
8. Ahui MLB, Champy P, Ramadan A, Van LP, Araujo L, André KB, et al. Ginger prevents Th2-mediated immune responses in a mouse model of airway inflammation. In Immunopharmacol 2008; 8(12): 1626-1632.
9. Fujiwara M, Hirose K, Kagami S-i, Takatori H, Wakashin H, Tamachi T, et al. T-bet inhibits both T H 2 cell–mediated eosinophil recruitment and T H 17 cell–mediated neutrophil recruitment into the airways. J Allergy Clin Immunol 2007; 119(3): 662-670.
10. Krug N, Hohlfeld JM, Kirsten A-M, Kornmann O, Beeh KM, Kappeler D, et al. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNAzyme. N Engl J Med 2015; 372(21): 1987-1995.
11. Vale Pereira S, Todo Bom A, Geraldes L, Schmidt Weber C, Akdis C, Mota Pinto A.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

FoxP3, GATA 3 and T bet expression in elderly asthma. Clin Exp Allergy 2011; 41(4): 490-496.

12. Finotto S, Glimcher L. T cell directives for transcriptional regulation in asthma. Springer Semin Immunopathol 2003; 25(3): 281-294.
13. Kim SH, Hong Jh, Lee YC. Oleanolic acid suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Th2-mediated allergic asthma by modulating the transcription factors T-bet, GATA-3, RORγt and Foxp3 in asthmatic mice. Int Immunopharmacol 2014; 18(2): 311-324.
14. Yuan Y, Yang B, Ye Z, Zhang M, Yang X, Xin C, et al. Sceptridium ternatum extract exerts antiasthmatic effects by regulating Th1/Th2 balance and the expression levels of leukotriene receptors in a mouse asthma model. J Ethnopharmacol 2013; 149(3): 701-706.
15. Toldi G, Molvarec A, Stenczer B, Müller V, Eszes N, Bohács A, et al. Peripheral Th1/Th2/ Th17/regulatory T-cell balance in asthmatic pregnancy. Int Immunol 2011; 23(11): 669-677.
16. Zhang T, Yang Z, Yang S, Du J, Wang S. Immunoregulatory effects of paeoniflorin exerts anti-asthmatic effects via modulation of the Th1/Th2 equilibrium. Inflammation 2015; 38(6): 2017-2025.
17. Siegmund K, Rückert B, Ouaked N, Bürgler S, Speiser A, Akdis CA, et al. Unique phenotype of human tonsillar and in vitro-induced FOXP3+ CD8+ T cells. J Immunol 2009; 182(4): 2124-2130.
18. Abbosh PH, Wang M, Eble JN, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Montironi R, et al. Hypermethylation of tumor-suppressor gene CpG islands in small-cell carcinoma of the urinary bladder. Mod Pathol 2008; 21(3): 355-362.
19. Wong C, Ho C, Ko F, Chan C, Ho A, Hui D, et al. allergic asthma. Clin Exp Immunol 2001; 125(2): 177-183.
20. Xu D, Wang Y, Chen Z, Li S, Cheng Y, Zhang L, et al. Prevalence and risk factors for asthma among children aged 0–14 years in Hangzhou: a cross-sectional survey. Respir Res 2016; 17(1): 122.
21. Raghavan D, Jain R. Increasing awareness of sex differences in airway diseases. Respirology 2016; 21(3): 449-459.
22. de Groot JC, Ten Brinke A, Bel EH. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. ERJ Open Res 2015; 1(1): 00024-2015.
23. Amelink M, de Groot JC, de Nijs SB, Lutter R, Zwinderman AH, Sterk PJ, et al. Severe adult-onset asthma: a distinct phenotype. J Allergy Clin Immunol. 2013;132(2):336-341.
24. Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. Int Arch Allergy Immunol 1998; 115(4): 257-269.
25. Barrett NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. Immunity 2009; 31(3): 425-437.
26. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157(1): 4-9.
27. Zhu M, Liang Z, Wang T, Chen R, Wang G, Ji Y. Th1/Th2/Th17 cells imbalance in patients with asthma with and without psychological symptoms. Allergy Asthma Proc 2016: 37(2): 148-156.
28. Rogala B, Bozek A, Gluck J, Jarzab J. Prevalence of IgE-mediated allergy and

www.SID.ir

Archive of SID

evaluation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with severe bronchial asthma. Postep Dermatol Alergol 2015; 32(4): 274-280.

29. Lee JS, Lee C-M, Jeong Y I, Jung ID, Kim B-H, Seong E-Y, et al. D pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin induced asthma. FEBS Lett 2007; 581(1): 57-64.
30. You Lu, Malmhäll C, Sjöstrand M, Rådinger M, O'Neil SE, Lötvall J, et al. Expansion of CD4+ CD25+ and CD25-T-Bet, GATA-3, Foxp3 and RORγt cells in allergic inflammation, local lung distribution and chemokine gene expression. PloS One 2011; 6(5): e19889.
31. Dong L, Chen M, Zhang Q, Li LZ, Xu XQ, Xiao W. T-bet/GATA-3 ratio is a surrogate measure of Th1/Th2 cytokine profiles and may be novel targets for CpG ODN treatment in asthma patients. Chin Med J 2006; 119(16): 1396-1399.
32. Yong J, Chen GQ, Huang B, Wu S. Correlation between the ratio of T-bet/GATA-3 and the levels of IL-4 and IFN-γ in patients with allergic asthma. Mol Med Rep 2011; 4(4): 663-666.
33. Braun CM, Huang S-K, Bashian GG, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Essayan DM. Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses. J Allergy Clin Immunol 1997; 100(3): 400-407.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:48 +0430 on Wednesday May 31st 2017

www.SID.ir