



بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن بتا ۱ رسپتور اینتر لوکین ۱۲

و بیماری سل ریوی در بین جمعیت ایرانی

نورالهدی سعداپی جهرمی^{۱*}، دکتر پریسا فرنیآ^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 میکرو بیولوژی، 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 توبریکلوسیس علائم بیماری را از خود بروز می دهند. این مساله نقش عوامل ژنتیکی را در حساسیت ابتلا به این بیماری را نشان می دهد. 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 - توصیفی بر روی ۱۲۰ بیمار سل ریوی و ۱۶۷ کنترل سالم انجام شد. پلی مورفیسم های 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 ($p \leq 0/05$). همچنین هیچ گونه ارتباط معناداری بین پلی مورفیسم های ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و حساسیت به سل ریوی وجود نداشت.

نتیجه گیری: با وجود عدم ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و سل ریوی به دلیل نقش موثر عوامل ژنتیکی در حساسیت نسبت به بیماری ها، انجام پژوهش های بیشتر در این مورد پیشنهاد می گردد.

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

دریافت مقاله: زمستان ۸۷ پذیرش برای چاپ: بهار ۸۸

مقدمه

که تفاوت های ژنتیکی میزبان در پاسخ ایمنی بدن ممکن است روی حساسیت به عفونت مایکوباکتریایی تاثیر گذار باشد (۱). اینترلوکین ۱۲ یک سیتوکین هتروداایمر تشکیل شده از دو زیر واحد گلیکوپروتئینی به نام های P35 و P40 است که با پیوند دی سولفیدی به یکدیگر متصل می باشند. این سیتوکین به وسیله سلولهای دندریتیک و فاگوسیت های فعال شده ترشح می شود و نقشی اساسی را در تحریک پاسخ های ایمنی سلول های T کمکی نوع ۱ و ایمنی سلولی ایفا می کند. تکثیر سلول های T و سلول های کشنده طبیعی، افزایش فعالیت سیتولیتیک سلول های کشنده طبیعی و سلول های T و همچنین تولید اینترفرون گاما به واسطه سلول های T و القای سلول های کشنده طبیعی مهم ترین

بیماری سل (توبریکلوسیس) پس از ایدز مهم ترین 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 می دهند و تقریباً یک سوم جمعیت دنیا به مایکوباکتریوم توبریکلوسیس 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 می شوند. در همین راستا بررسی های انجام شده روی دو قلوها و تحقیقات نژادی نشان دادند

* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکرو بیولوژی

برای این مطالعه در توالی های کد کننده ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی به نام های ۱۶۳۷G/A و ۱۶۶۴C/T + که باعث جهش های بی معنی می شود مشخص گردید. برای تکثیر این دو ناحیه از جفت پرایمرهای: 3'-cct-3' و 5'-ggctgtgtagcccag استفاده شد.

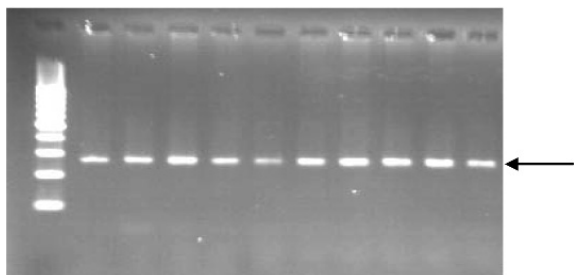
واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد و به مدت ۴ دقیقه انجام شد. سپس واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال پرایمر در ۵۷ تا ۵۸ درجه و طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه (همگی ۳۰ ثانیه) انجام شد. پس از ۳۰ چرخه PCR، طولیل شدن نهایی در حرارت ۷۶ درجه و به مدت ۶ دقیقه انجام شد. در نهایت محصول PCR با 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 داده ها با استفاده از آزمون های دقیق فیشر و مربع کای انجام شد. همچنین نتایج بدست آمده با استفاده از معادله هاردی-واینبرگ مورد آنالیز قرار گرفت. مرز معنی داری در $p \leq 0/5$ قرار داده شد.

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

یافته ها

در بررسی افراد بیمار و سالم، برش ها در دو ناحیه ۱۶۶۴C/T +



شکل ۲: قطعه ۲۶۴ جفت بازی محصول هضم آنزیمی *BsrI* برای شناسایی موتاسیون ۱۶۳۷G/A در ژن بتا ۱ اینترلوکین ۱۲.

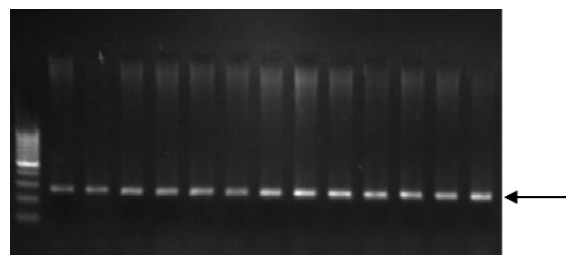
عملکردهای بیولوژیک اینترلوکین ۱۲ محسوب می شوند (۲). تولید اینترفرون گامای القا شده با اینترلوکین ۱۲ یک ارتباط مهم را بین ایمنی ذاتی و سلولی ایجاد می کند. نکته مورد توجه اغلب دانشمندان، ارتباط عدم حضور P40 یا رسپتور بتا ۱ این سیتوکین در مقایسه با عدم حضور رسپتور بتا ۲ (P35) با انتشار بیماری توبرکیلوسیس می باشد. این مساله منجر به مطالعات گسترده و وسیع تری در زمینه نقش سیتوکین های وابسته به زیر واحد P40 و سایر سیتوکین های 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 می دهد. هدف از این پژوهش، ارزیابی پلی مورفیسم ژن 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 میلی لیتر خون محیطی تهیه و در لوله حاوی اتیلن دی آمین تترا 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-هایپک 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، ۰/۱ 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.

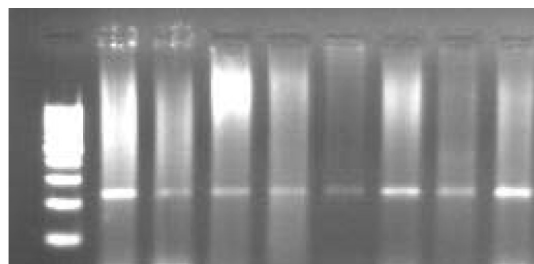
رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و بیماری سل در بین جمعیت هنگ کنگ پیشنهاد کردند (۶). همچنین رموس و همکاران در سال ۲۰۰۴ رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ خطر ابتلا به بیماری سل ریوی را افزایش می دهند (۷). هی وون لی و همکاران در سال ۲۰۰۵ یک ارتباط بین پلی مورفیسم های رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و سل ریوی در جمعیت کره 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 ۲۰۰۴ که روی ناحیه ۱۱۸۸ - 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 گسترده تری 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 گسترده تری برای اثبات دقیق تر ارتباط حقیقی بین پلی مورفیسم های ژن رسپتور بتا ۱ اینترلوکین ۱۲ و بیماری سل ریوی پیشنهاد می شود. این مطالعه هرگونه ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن رسپتور بتا ۱ در نواحی ذکر شده و بیماری سل ریوی را در جمعیت ایرانی رد می کند.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدر دانی خود را از مرکز تحقیقات میکوباکتریولوژی پژوهشکده سل و بیماری های ریوی به دلیل حمایت های مالی و اجرایی اعلام می دارند.



شکل ۳: قطعه ۲۲۵ جفت بازی محصول هضم آنزیمی *Tail* 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 (G/G, G/A, A/A); +۱۶۳۷G/A و T/T، C/C, C/T; +۱۶۶۴C/T) ظاهر می شوند. اما تمامی ژنوتیپ های به دست آمده در این مطالعه در معادله هاردی - واینبرگ سازگاری نداشتند. بین بیماران و افراد سالم هیچ گونه تفاوت قابل ملاحظه ای 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 عفونت های شدید مسری مانند سالمونلا و مایکوباکتریوم ها گزارش شده اند (۳). یک مورد گزارش درباره جهش های 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 مورفیسم های 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 هاپلوتیپ های ژن

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-deficient patients. *Science.* 1998; 280: 1435-1438.
4. Altare F, Ensser A, Breiman A, Reichenbach J, Baghdadi JE, Fischer A, Emile JF, Gaillard

- JL, Meinel 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. Kusuvara 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.



Association between IL-12 Receptor beta-1 gene polymorphisms and Tuberculosis between Iranian Population

**Noorolhoda Saadaee Jahromi¹, Parissa Farnia², Mohammad Kargar¹,
Mehdi Kazem pour², Jamileh Nowroozi³, Mohammad Reza Masjedi²,
Aliakbar Velayati²**

¹Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

²Mycobacterium Research Center (MRC), National Research Institute Of Tuberculosis and Lung Disease (NRIITLD)

³Department of Microbiology, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and objectives: Tuberculosis (TB) is the most common cause of death due to infectious disease, worldwide. In fact only 10% of people infected with *Mycobacterium tuberculosis* develop clinical disease which suggests, the role of host genetic factors in susceptibility against TB. For this reason, we aimed to determine IL-12 gene polymorphism among PTB cases.

Material and method: A case-control study was carried out in one hundred twenty TB patient and one hundred sixty seven healthy control individuals. The Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in 5 regions of IL12 RB1 gene +705A/G +1158T/C, +1196G/C, +1664C/T and +1637 G/A were determined by PCR-RFLP.

Results: No significant differences were detected at +1664 C/T and +1637 G/A allele frequencies.

Conclusion: In this study, the IL-12 gene polymorphism at +1664 C/T and +1637G/A allele were associated with susceptibility against TB. Although, further studies suggested on more number of samples.

Keywords: Interleukin 12, Polymorphism, *Mycobacterium tuberculosis*, Beta-1 receptor