مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۲۳- ۱۵

بررسی سطح سرمی و پلی مورفیسم TNF-α و IFN-γ به روش‌های ELISA و PCR-RFLP در بیماران مبتلا به سل ریوی و مقایسه آن با افراد سالم

مهدیه بیات[1*]، جمیله نوروزی[1]، پرویز پاکزاد[1]، پریسا فرنیا[2]، صابر انوشه[2]، سید مهران مرعشیان[2]، محمد ورهرام[2]، مهدی کاظم پور[2]، محمد رضا مسجدی[2]، علی اکبر ولایتی[2]

۱)گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۲)مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی(MRC)، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)،بیمارستان مسیح دانشوری، دارآباد، تهران
نویسنده رابط: مهدیه بیات، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
همراه: ۰۹۱۲۲۸۳۸۲۵۵ kavoshgroup597@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۴/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۸

چکیده:

زمینه و اهداف: مقاومت یا ایمنی سلولی در برابر عفونت توبرکولوز، بستگی به عملکرد لمفوسیت‌های T، که فعال کننده ماکروفاژهای از بین برنده مایکوباکتریوم‌های داخل سلولی‌اند، دارد. لمفوسیت‌های T از طریق ترشح شبکه‌ای از فاکتورهای محلول سایتوکاین‌ها، مسئول این روابط سلولی‌اند و طی سه دهه اخیر به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اولین رخداد عفونت در میزبان با یک پاتوژن، پاسخ ایمنی ذاتی است که شامل عملکرد سایتوکاین‌هایی همچون TNF-α و IFN-γ می‌باشد. هدف از این مطالعه، تعیین فراوانی موتاسیون‌های ژن TNF-α و IFN-γ به روش PCR-RFLP و اندازه گیری سطح سرمی این دو سایتوکاین در دو گروه شاهد و بیمار به روش ELISA و ارتباط آنها با بیماری سل ریوی بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی (case-control) ۹۳ بیمار مبتلا به سل ریوی با اسمیر مثبت از بیمارستان مسیح دانشوری انتخاب شدند. گرده شاهد شامل ۱۰۳ فرد سالم، بدون هیچ سابقه به توبرکولوز بود. ژنوتیپ پنج ناحیه از TNF-α و یک ناحیه از IFN-γ با استفاده از روش PCR-RFLP شناسایی شد. میزان سطح سرمی این دو سایتوکاین با استفاده از روش ELISA بررسی شد. اطلاعات روش ELISA با آزمون Mann-Withney U بدست آمد. برای یافتن نقطه حد نصاب (cut off)از ROC curve استفاده شد. داده‌های روش PCR-RFLP با آزمون دقیق فیشر، تجزیه وتحلیل شد.

یافته ها: با روش PCR-RFLP، تفاوت معنی داری در دو منطقه TNF-308 وTNF-857 از نظر فراوانی موتاسیون میان دو گروه شاهد و مورد مشاهده شد ($P < 0.05$). در روش ELISA تفاوت معنی داری میان دو گروه شاهد و مورد در باره IFN-γ وجود داشت ($P < 0.05$). یک نقطه حد نصاب (cut off) به عنوان مارکر سرولوژیک برای بررسی سریع‌تر توبرکولوز میان نقاط OD مثبت و منفی به دست آمد. این نقطه cut off برای IFN-γ ، ۱۹mg/dl/. بود.

نتیجه گیری : موتاسیون در دو نقطه ۸۵۷- و۳۰۸ - TNF-α به طور معنی دار دیده شد. این تفاوت در هیچ یک از نقاط دیگر TNF-α و IFN-γ مشاهده نشد. نتایج روش ELISA نشان داد پاتوژن‌های مایکوباکتریایی به تولید سایتوکاین‌هایی نظیر IFN-γ به‌طور فراوان وابسته هستند. تست‌های سرولوژیک، با توجه به نقطه حد نصاب (cut off) IFN-γ ، به بیماران کمک می‌کند تا در افراد توبرکولوز مثبت، نتایج سریع تر مورد شناسایی قرار گیرند.

کلید واژه ها: توبرکولوز، IFN-γ ، TNF-α، PCR-RFLP، ELISA

مقدمه:

بیماری سل، نمونه‌ای از عفونت با نوعی باسیل درون سلولی است که در آن، ایمنی حفاظتی و ازدیاد حساسیت پاتولوژیکی همراه با هم وجود دارند. ضایعات بافتی نیز به‌طور عمده در اثر پاسخ‌های ایمنولوژیک میزبان ایجاد می‌شود. بعد از آلوده شدن میزبان به *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*، بدن با ترشح سایتوکاین‌هایی از خود در مقابل این میکروارگانیسم به عنوان یک آنتی ژن، محافظت می‌کند. از جمله مهم‌ترین این سایتوکاین‌ها، می‌توان به TNF-α و IFN-γ اشاره کرد (۱و۲). بیماری سل، همچنان یکی از مشکلات بزرگ بهداشتی بسیاری ازکشورهای جهان است. مرگ و میر سالیانه بیش از ۳ میلیون از مجموع ۲۵ میلیون مسلول در جهان و مسلول شدن میلیون‌ها انسان در هر سال، برگ سیاهی در تاریخ تمدن بشری در قرن بیست‌ویکم است. در حال حاضر، یکی از مشکلات موجود در برنامه سل، حتی در برخی از کشورهای توسعه یافته، تاخیر در تشخیص می‌باشد(۲). حساسیت به این بیماری در میان افراد مختلف، متفاوت است. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از عوامل میزبانی و به‌ویژه حساسیت ژنتیکی افراد به این بیماری باشد(۳). سایتوکاین‌ها، پروتئین‌های ترشح شده از سلول‌های ایمنی ذاتی و سازشی (adaptive) هستند که بسیاری از اعمال این سلول‌ها را میانجی‌گری می‌کنند(۴). سایتوکاین‌هایی که در پاسخ به آنتی‌ژن‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند، در ایجاد التهاب و ایمنی دخالت دارند(۵). در واقع، TNF-α وIFN-γ در فرایند دفاع میزبانی در برابر عفونت‌های مایکوباکتریایی دارای نقش محوری می‌باشند(۲و۶).

با اندازه گیری سطح سرمی و همچنین ژنوتایپینگ TNF-α و IFN-γ با روش های ELISA وPCR- RFLP در تلاش هستیم تا با بررسی‌های انجام شده بتوانیم به طور قطع حضور و یا عدم حضور چشمگیر این سایتوکاین‌ها را در افراد بیمار و سالم تشخیص دهیم. لذا، هدف از این مطالعه، تعیین سطح سرمی دو سایتوکاین TNF-αو IFN-γ و همچنین تعیین ارتباط پلی مورفیسم آنها در جایگاه‌های مختلف از نظر ایجاد موتاسیون‌های ایجاد شده بود. تا بر این اساس، نقش این سایتوکاین‌ها بر کارآیی و قابلیت پاسخ‌های ایمنی در برابر عفونت *مایکو باکتریوم توبرکولوزیس* به عنوان عامل تشخیصی، شناسایی گردد.

مواد و روش‌ها:

برای ارزیابی سایتوکاین‌های IFN-γ و TNF-α در بیماران مسلول و مقایسه آنها با افراد شاهد از دو روش PCR-RFLP و ELISA استفاده شد. طرح حاضر در قالب مورد - شاهدی (Case-Control) صورت گرفت. ۹۳ بیمار مبتلا به سل ریوی با اسمیر مثبت از بیمارستان مسیح دانشوری انتخاب شدند. ۱۰۳ نفر شاهد سالم بدون هیچ سابقه‌ای از بیماری سل گروه شاهد را تشکیل دادند. سن متوسط بیماران مبتلا به سل ریوی ۵۰ سال و افراد شاهد ۳۹ سال بود. اطلاعات حاصل از روش ELISA با روش آماری Mann-Withney U به دست آمد. برای یافتن نقطه حد نصاب (cut off) از منحنی ROC استفاده گردید. همچنین اطلاعات حاصل از روش PCR-RFLP با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون دقیق فیشر، تجزیه و تحلیل شد.

به طور خلاصه مراحل کارPCR-RFLP به شرح ذیل بود :

۱- ۱۰میلی‌لیتر نمونه خون افراد مورد مطالعه جمع‌آوری شد. اطلاعات بیماران با استفاده از پرسشنامه (شامل نام و نام خانوادگی، جنسیت، سن، ملیت، شهرستان محل سکونت، آدرس و شماره تلفن محل سکونت، سابقه ابتلا به بیماری سل در خانواده و نزدیکان، زمان تشخیص بیماری، سابقه بستری و درمان و مشخصات پزشک معالج) جمع‌آوری گردید.

۲- ۳ تا ۵ میلی لیتر از نمونه خون به لوله فالکون حاوی ۲۰۰λ EDTA ۵٪ منتقل شد. این نمونه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در دور ۱۳۰۰ rpm سانتریفوژ شد. بعد از جداسازی پلاسما، جهت انجام تست سرولوژی (ELISA) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. از باقیمانده محتوای لوله‌ها برای استخراج DNA ، با استفاده از روش فنل-کلروفرم ایزو آمیل الکل، استفاده شد.

۳- انجام PCR-RFLP که شامل مراحل:

الف- محاسبه مقادیر برای تهیه Master mix در روش PCR و انجام PCR که منجر به تهیه PCR Product گردید.

ب – انجام گرادیان MgCl2 و گرادیان دمایی برای تنظیم هر پرایمر در دستگاه PCR.

ج- الکتروفورز، مشاهده و آنالیز باندهای حاصل از محصول PCR.

د- هضم آنزیمی محصولات PCR.

ه- الکتروفورز ، مشاهده و آنالیز باندهای حاصل از هضم آنزیمی.

۴- انجام روش ELISA .

روش PCR-RFLP برای IFN-γ-179

در ابتدا گرادیان دمایی و گرادیان MgCl2 برای پرایمر ۱۷۹- به صورت جداگانه در دستگاه PCR تنظیم گردید.

در مورد IFN-γ ، برای بررسی پلی مورفیسم ناحیه ۱۷۹- ، ابتدا PCR با استفاده از جفت پرایمرهای

5'-ATCAAT GTG CTT TGT GAA TGAA-3′ و

5'-CCG AGA GAA TTA AGC CAA AGA - 3′

، انجام شد و قطعه تکثیر یافته که طولی در حدود ۴۶۱ bp داشت تحت تاثیر آنزیم *AvaII* قرار گرفت.

در مورد TNF-α ، برای بررسی پلی مورفیسم ناحیه ۳۰۸- ابتدا با استفاده از جفت پرایمر

5′-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3′ و5′-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3′ ، PCR انجام گردید و قطعه تکثیر یافته که طولی در حدود 107bp داشت تحت اثر آنزیم *Nco I* (با نام تجاری *Bsp 19 I*) قرار گرفت.

همچنین برای بررسی پلی مورفیسم در نواحی ۲۳۸- و ۲۴۴- با استفاده از جفت پرایمر

5'-CCT CAA GGA CTC AGC TTT CTG -3' و 5'-ACA CTC CCC ATC CTC CCA GATC-3' ناحیه مورد نظر تکثیر داده شد. قطعه بدست آمده که در حدود ۲۳۰bp می‌باشد، تحت اثر آنزیم‌های برش‌دهنده قرار گرفت. برای ناحیه ۲۳۸- از آنزیم *Bgl II* و برای ناحیه ۲۴۴- از آنزیم *Bsaj I* استفاده شد.

در ادامه پلی مورفیسم نواحی ۸۵۷- و ۸۶۳- مورد بررسی قرار گرفتند. به ترتیب، PCR با استفاده از جفت پرایمرهای

5'-GGC TCT GAG GAA TGG GTT AC-3' و

5'-CCT CTA CAT GGC CCT GTC TAC- 3'

5'-GGC TCT GAG GAA TGG GTT AC-3' و

5'-CTA CAT GGC CCT GTC TTC GTT ACG-3'

، انجام گرفت. قطعات تکثیر یافته به ترتیب دارای طولی در حدود ۱۲۷ bp و ۱۰۵ bp بودند که تحت اثر آنزیم *Tai I* قرار گرفتند. (نکته: برای تمام ژل‌ها از مارکر ۱۰۰bp استفاده شد و برای بررسی اثر آنزیم و مشاهده الگوی برش، همه نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز الکتروفروز شدند). البته ذکر این نکته ضروری است که در همه نواحی مورد بررسی واجد پلی مورفیسم، الگوی حاصل از هضم آنزیمی ممکن است به صورت هتروزیگوت یا هموزیگوت ظاهر شوند .

روش ELISA برای سنجش سطح سرمی TNF-α و IFN-γ

در بیماران مسلول و مقایسه آنها با افراد شاهد از کیت‌های مربوطه (human kits IFN-γ & TNF-α) محصول کمپانی Bender med systems (استرالیا) ، استفاده گردید.

مراحل کار ELISA :

بر روی پلاسمای خون گروه مورد و شاهد ، مراحل ذیل به ترتیب انجام گرفت :

۱- نوارهای حاوی چاهک‌های کوچک با محلول شستشو دو بار مورد شستشو قرار گرفت.

۲- محلول استاندارد طبق دستور العمل آماده گردید.

۳- ۱۰۰µl از sample diluents به تمام چاهک‌های ردیف مخصوص استاندارد اضافه شد.

۴- ۱۰۰µl از محلول استاندارد به اولین چاهک استاندارد اضافه شد. سپس با روش تیتراسیون به ترتیب ۱۰۰µl از اولین چاهک به دومین چاهک و به همین ترتیب تا آخرین چاهک اضافه شد. ۱۰۰µl آخرین چاهک خارج گردید.

۵- ۱۰۰µl از sample diluents به چاهک بلانک اضافه شد.

۶- ۵۰µl از sample diluents به چاهک‌های نمونه‌ها اضافه گردید.

۷- ۵۰µl از نمونه های سرم به چاهک های نمونه‌ها اضافه شد.

۸- محلولBiotin-conjugate (به عنوان آنزیم کونژوگه) آماده شد و به اندازه ۵۰µl به همه چاهک‌ها اضافه گردید..

۹- روی نوارها با فیلم مخصوص پوشانده شد، و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۱۰- محلول‌های درون چاهک‌ها خالی شد، و سه مرتبه مجدداً شستشو داده شد.

۱۱- محلول streptavidin-HRP (به عنوان آنزیم دوم) آماده گردید و به میزان ۱۰۰µl به همه چاهک‌ها اضافه شد.

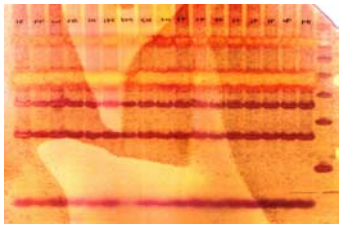
۱۲- روی چاهک‌ها با فیلم مخصوص پوشانده شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

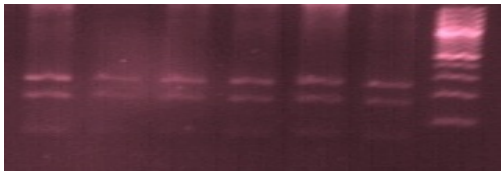
۱۳- محلول های درون چاهک‌ها خالی شد و مانند مرحله قبل، سه مرتبه شستشو داده شد.
۱۴- ۱۰۰µl از سوبسترای TMB (به عنوان رنگزا) به همه چاهک‌ها اضافه گردید.
۱۵- نوارها برای مدت ۱۰ دقیقه در انکوبه شیکردار (این مرحله در تاریکی انجام شد) نگهداری شد.
۱۶- ۱۰۰µl از محلول متوقف کننده (Stop solution) به همه چاهک‌ها اضافه گردید.
۱۷- بلافاصله پلیت را در دستگاه ELISA-reader قرار داده شد و در طول موج ۴۵۰ نانومتر، ODها قرائت شدند.

یافته‌ها:

نتایج مربوط به PCR

در مورد IFN-γ، در صورتی که ناحیه ۱۷۹- دارای نوکلئوتید G باشد در سه ناحیه برش می‌خورد و در صورتی که در این ناحیه، نوکلئوتید T مستقر باشد در دو ناحیه برش خواهد خورد. پس از هضم محصول PCR با آنزیم *AvaII*، ۴ نوع باند مشاهده گردید: (bp ۴۰۱, bp ۲۴۲، bp ۱۵۹ و bp ۶۰). اگر باندهای bp ۲۴۲، bp ۱۵۹و bp ۶۰ ایجاد شود نشان دهنده موتاسیون G و اگر باندهای bp ۴۰۱ و bp۶۰ ایجاد شود نشان دهنده موتاسیونT است. ایجاد سه باند ۶۰ و ۱۵۹ و۲۴۲ bp ای نشان دهنده موتاسیون G می‌باشد . برای مثال، یکی از اشکال حاصل از هضم آنزیمی IFN-γ روی هر دو نوع ژل آگاروز و پلی آکریل آمید نشان داده شده است. هضم آنزیمی محصول PCR ژن ۱۷۹- IFN-γ روی ژل پلی آکریل آمید (شکل ۱- الف) وروی ژل آگاروز ۳٪ (شکل ۱- ب) نشان می‌دهد که مشاهده باندها روی ژل پلی آکریل آمید دقیق‌تر و واضح‌تر است.





الف) ب)

شکل۱: الف) هضم INF-γ ناحیه ۱۷۹- روی ژل پلی آکریل آمید . ب) همین هضم را روی ژل آگاروز ۳٪ نشان می‌دهد که پس از هضم با آنزیم *AvaII* ، ایجاد سه باند روی مکان‌های ۶۰ و ۱۵۹ و bp ۲۴۲ کرده است. این باندها گویای ژنوتیپ هموزیگوت GG می‌باشند. باند اول نشان دهنده مارکر ۱۰۰bp است.

در مورد ناحیه ۳۰۸- از TNF-α در صورتی که این ناحیه واجد نوکلئوتید G باشد برش می‌خورد، اما در صورت وجود نوکلئوتید A برش نخواهد خورد. در صورتی که قطعه مورد نظر برش خورده باشد دو قطعه bp ۲۰ و bp ۸۷ قابل مشاهده خواهند شد.
در صورتی که ناحیه ۲۴۴- و۲۳۸- واجد نوکلئوتید G باشند برش خورده و در صورتی که دارای نوکلئوتید A باشد برش نخواهد خورد .
اما در مورد ناحیه ۸۵۷- از TNF-α ، در صورتی که نوکلئوتید C مستقر باشد برش خورده و در صورت وجود نوکلئوتید T برش نخواهد خورد .در صورتی که در ناحیه ۸۶۳- نوکلئوتید C موجود باشد برش نخورده ولی اگر A وجود داشته باشد برش می‌خورد .
در آنالیز ژنوتایپینگ پلی مورفیسم IFN-γ در ناحیه ۱۷۹- ، همه آلل‌ها به صورت هموزیگوت در آمده‌اند. بنابراین، هیچ گونه موتاسیونی در این ناحیه رخ نداده است، و نمی‌توان به عنوان عامل تشخیصی روی این نوع پرایمر کار کرد. در مورد پرایمرهای TNF-α، پرایمرهای ۳۰۸- و ۸۵۷- دارای ارزش تشخیصی بودند($p<0.05$). پرایمرهای ۸۶۳- و ۲۳۸- دارای ارزش تشخیصی نبودند($p>0.05$). در مورد پرایمر۲۴۴- از TNF-α نیز به دلیل اینکه همه پرایمرها هموزیگوت بودند نمی‌توان از آن به عنوان عامل تشخیصی استفاده کرد(جدول ۱).

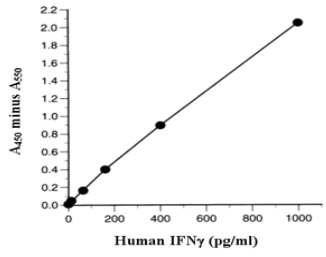
جدول ۱: توزیع فراوانی ژنوتایپینگ مناطق مختلف ژن‌های TNF-α و IFN-γ با روش PCR-RFLP

	ژنوتیپ سایتوکاین	مورد:۹۳N		شاهد:۱۰۳N		P Value
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	
IFNγ-179 GG/TT	GG	۹۳	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۰	P>0.05
TNFα-308 AA/GG	GA	۹	۹/۷	۱۶	۱۵/۵	**P<0.05**
	GG	۸۴	۹۰/۳	۸۷	۸۴/۵	
TNFα-238 AA/AG	GG	۶۸	۷۳/۱	۹۸	۹۵/۱	P>0.05
	AG	۷	۷/۵	۵	۴/۹	
	AA	۱۸	۱۹/۴	۰	۰	
TNFα-244 GG/AA	GG	۹۳	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۰	……..
TNFα-863 AC/AA	AA	۳	۳/۲	۰	۰	P>0.05
	CA	۲۱	۲۲/۶	۲۹	۲۸/۲	
	CC	۶۹	۷۴/۲	۷۴	۷۱/۸	
TNFα-857 CC/TT	CC	۵۱	۵۴/۸	۸۳	۸۰/۶	P<0.05
	TC	۴۱	۴۴/۱	۱۸	۱۷/۵	
	TT	۰	۰	۲	۱/۹	

با توجه به میزان فراوانی ایجاد موتاسیون در ژنوتایپ‌های مناطق مختلف در TNF-α و IFN-γ ، تنها در منطقه ۳۰۸- و ۸۵۷- از TNF-α ، تفاوت معنی داری از نظر ایجاد موتاسیون وجود دارد. بنابراین، این دو منطقه می‌توانند از نظر بالا بردن قابلیت ابتلا به بیماری سل حائز اهمیت باشند. در ناحیه ۱۷۹- ژن IFN-γ و نواحی ۲۳۸- ، ۲۴۴- ، ۸۶۳- در ژن TNF-α یا موتاسیون رخ نداده و یا درصد فراوانی آن کم و بی معنی است. به همین دلیل این دو منطقه در بالا بردن قابلیت ابتلا به بیماری سل نمی‌توانند حائز اهمیت باشند.

نتایج مربوط به ELISA

پس از اندازه‌گیری سطح غلظت سایتوکاین‌های ذکرشده با استفاده از منحنی ذیل، ODها را روی محور غلظت عمود کرده و غلظت مربوط به هر OD بر حسب pg/ml (پیکو گرم بر میلی لیتر) به دست آمد.

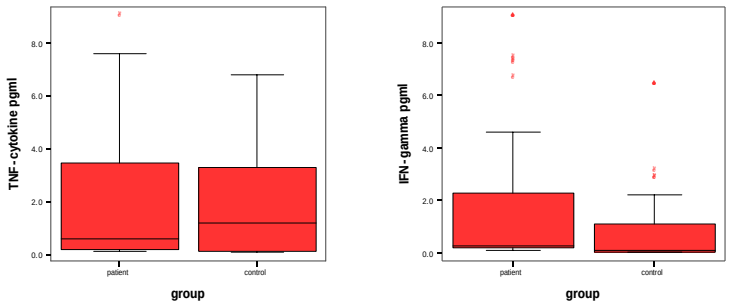


در نمونه‌های پلاسمای مورد آزمایش، در مورد TNF-α هیچ همبستگی بین دو گروه شاهد و مورد وجود نداشت. در IFN-γ بین دو گروه شاهد و مورد همبستگی مشاهده گردید (جدول ۲) و (نمودار۱ – الف).

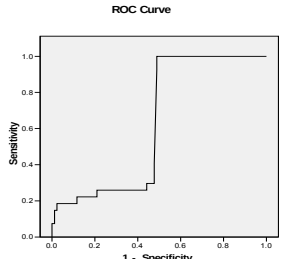
با توجه به اختلاف معنی‌داری که در بین گروه‌های شاهد و مورد در سایتوکین IFN-γ مشاهده شد یک نقطه حد نصاب (cut off) در آن بررسی شد، تا بتوان از آن به عنوان یک عامل سرولوژیک برای تشخیص سریع بیماری سل استفاده کرد (نمودار ۱– ب).

جدول۲: میانگین سطح سرمی IFN-γ و TNF-α در بیماران مبتلا به سل ریوی و گروه شاهد

control					case					
Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum	Mean	
۲/۱	۰/۱	۱/۲	۶/۸	۱/۹	۲/۰	۰/۱	۱/۰	۷/۰	۲/۰	αTNF-cytokine level
۰/۹	۰	۰/۱	۶/۴	۰/۶	۲/۰	۰/۱	۰/۴	۷/۴	۱/۶	IFN- γ cytokine level



الف



ب

نمودار ۱: الف)میزان همبستگی IFN-γ و TNF-α در دو گروه شاهد و بیمار. همبستگی در IFN-γ وجود دارد، در مورد TNF-α مشاهده نمی شود. ب) نقطه حد نصاب(cut off)در ناحیه ۱۷۹- IFN-γ

بحث:

در سال‌های اخیر محققین زیادی در تلاش‌اند تا با استفاده از روش‌های مختلف سرولوژی و مولکولی ارتباطی را میان سطح سرمی سایتوکاین‌های محرک *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* (IL-10، IL-12، IFN-γ، TNF-α) و بیماری سل پیدا کنند. همچنین با بررسی‌های ژنوتیپی به جستجوی مناطق موتاسیون‌زای محرک ژنی پرداخته‌اند و نتایج عمده‌ای نیز به دست آورده‌اند (۲).

در سال ۲۰۰۲، مطالعاتی در شیکاگو به وسیله Ping An روی TNF-α صورت گرفت. اما، رابطه‌ای را بین منطقه ژنی موتاسیون‌زا و قابلیت ابتلا به سل بین گروه‌های مورد و شاهد نیافتند (۷).

در مطالعه حاضر، در IFN-γ ، در منطقه ۱۷۹- از نظر پلی مورفیسم همگی هموزیگوت هستند(GG) که ارزش تشخیصی در این مورد وجود ندارد. همین طور IFN-γ از نظر سطح سرمی نیز مورد بررسی قرار گرفت. بر خلاف TNF-α ، مشاهده شد که سطح سرمی IFN-γ در دو گروه مورد و شاهد تفاوت معنی‌دار دارد.

در سال ۲۰۰۳، در اسپانیا Dolores Lopes-Mderuelo ، روی ژن IFN-γ ناحیه T/A ۸۷۴+ ، ژن ۱۰- IL ناحیه G/A ۱۰۸۲- و ژن TNF-α ناحیه A ۳۰۸- در بیماران مبتلا به سل ریوی مطالعه نمود. او نشان داد که فقط در مورد IFN-γ ناحیه T/A ۸۷۴+ ، رابطه معنی‌داری با عفونت سل ریوی وجود دارد (p= ۰/۰۰۰۰۸). این ارتباط معنی دار در مورد IL ۱۰- و TNF-α مشاهده نگردید. یافته‌های این مطالعه حاکی از آن است که ژن IFN-γ ناحیه T/A ۸۷۴+ ، دارای اهمیت ویژه‌ای به عنوان عامل ژنتیکی برای مقاومت به بیماری سل محسوب می‌شود. بنابراین، نقص ژنتیکی در تولید IFN-γ در افراد هموزیگوت برای آلل A ۸۷۴+ IFN-γ می‌تواند موجب افزایش خطر آن در پیشرفت بیماری سل شود. پیشنهاد شد چنانچه طراحی‌ها و دستکاری‌هایی روی این ژن انجام دهند بعید نیست که بتوان از این ناحیه ژنی، در ساخت واکسن بر علیه بیماری سل استفاده نمود (۸).

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۳ توسط Awomoyi و Newport در گامبیا روی پلی مورفیسم گیرنده ۱ IFN-γ انجام شد. آنها به این نتیجه رسیدند که IFN-γ برای دفاع و ایمنی میزبان بر علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌ها به ویژه بر علیه پاتوژن‌های مایکوباکتریومی ضروری می‌باشد. کودکانی که فاقد زنجیره های گیرنده ۱ IFN-γ هستند، استعداد بالاتری برای ابتلا به بیماری‌های مایکوباکتریومی مثل سل دارند. بنابراین ایجاد موتاسیون بر روی ژن گیرنده ۱ از IFN-γ (IFN-γ R1) منجر به افزایش قابلیت ابتلا به عفونت‌های مایکوباکتریایی از جمله سل در افراد می‌گردد (۹).

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۵ در ایران، توسط میر سعیدی و طبرسی روی ارتباط میان پلی مورفیسم‌های گیرنده ۱ IFN-γ و بیماری سل ریوی انجام گرفت. نتایج نشان داد که میان ابتلاء به بیماری سل و لوکوس ۳۹۵ از گیرنده ۱ IFN-γ ارتباط وجود ندارد. میزان پلی مورفیسم هتروزیگوت در این لوکوس از ۵۰ فرد مورد آزمایش فقط ۲٪ گزارش گردید، که رقم معنی‌داری نبود و در بقیه افراد هیچ موتاسیونی دیده نشد (۱۰).

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۴ در برزیل توسط Martha Maria روی مناطق ۲۳۸- و ۳۰۸- از ژن TNF-α صورت گرفت. مشاهده شد که آلل ۳۰۸G- TNF-α و ۲۳۸A- TNF-α در ارتباط با افزایش ابتلا به سل می‌باشند (p= ۰/۰۰۰۰۲). بنابراین دو آلل ۲۳۸G- و ۳۰۸A- TNF-α ، یک عامل حفاظتی بر علیه *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* به شمار می‌روند. نتیجه گرفته شد که این دو آلل در این مناطق در اکثر مطالعات دارای ارزش تشخیصی هستند (۱۱).

همان طور که از نتایج مطالعه حاضر مشاهده می‌شود، در مورد دو منطقه روی ژن TNF-α، یعنی ۲۳۸- و۸۵۷ – ، موتاسیون به طور معنی‌داری در دو گروه مورد و شاهد مشاهده می‌شود. این دو منطقه می‌توانند دارای ارزش تشخیصی باشد. اما با توجه به اینکه این دو منطقه از نظر پلی مورفیسم ارزشمند می‌باشند آن را با استفاده از روش ELISA نیز مورد بررسی قرار دادیم. تا ارزیابی شود که آیا این تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مورد و شاهد در سطح سرمی آنها نیز مشاهده می‌شود یا خیر؟ در این مورد هم هیچ تفاوت معنی داری در سطح سرمی دو گروه مورد و شاهد در TNF-α مشاهده نشد.

در مورد IFN-γ که در منطقه ۱۷۹- از نظر پلی مورفیسم همگی هموزیگوت بودند و ارزش تشخیصی در این مورد وجود نداشت، نیز از نظر سطح سرمی مورد بررسی قرار گرفت. در این مورد بر خلاف TNF-α، مشاهده گردید که سطح سرمی در دو گروه مورد و شاهد دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد. در روش

ELISA در این مطالعه که مقایسه بین سطح غلظت سرمی سایتوکاین‌های IFN-γ وTNF-α در بین افراد مبتلا به سل ریوی با اسمیر مثبت و افراد سالم صورت گرفته است، تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته و یا مکتوب نشده است.

در انتها با توجه به مباحث ذکر شده مشاهده شد IFN-γ و TNF-α سایتوکاین‌های کلیدی در ایجاد التهاب در اثر آلودگی با *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* محسوب می‌شوند. با مطالعات گسترده‌تر و با شناسایی مناطق حساس موتاسیون‌زا در افراد مبتلا می‌توان علاوه بر روش‌های تشخیصی مولکولی در مدت زمان کوتاه‌تر، راه‌های درمانی مناسبی را نیز در این جهت بررسی کرد.

نتیجه‌گیری:

قابلیت ابتلا به توبرکولوزیس در دو منطقه ۳۰۸- و ۸۵۷- بر روی ژن TNF-α قابل بررسی و بحث است. مطالعه پلی مورفیسم روی ژن TNF-α نسبت به مناطق ژن IFN-γ برای بیماری سل ریوی تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد.

طبق یافته‌های مطالعه حاضر مشاهده شد، به دلیل اینکه نتایجی که در روش بررسی پلی مورفیسم با استفاده از PCR-RFLP به دست آمد، با یافته‌های روش ELISA منطبق و هماهنگ نبودند، بنابراین این دو روش در یک راستا و یک جهت نیستند. نمی‌توان با انجام یکی از این روش ها و به دست آوردن یک نتیجه آن را برای روش دیگر نیز تعمیم داد. لذا، موارد زیر نیز پیشنهاد می‌گردد:

۱- به کارگیری نمونه‌های بیشتر در گروه‌های سنی و جنسی و حتی در نژادهای مختلف مورد نیاز است.

۲- با روش PCR-RFLP و با طراحی پرایمرهای مختلف مناطق موتاسیون‌زای بیشتر و متنوع‌تری را در ژن‌های TNF-α و IFN-γ بررسی نمود. منطقه‌ای با اختلاف معنی دار در حد بالا بین گروه‌های مورد و شاهد شناسایی کرد .

۳- با دستکاری‌های ژنتیکی و همچنین مطالعات گسترده‌تر روی این مناطق حتی به روش‌های درمانی نظیر تولید واکسن بر علیه بیماری نیز نائل گردید.

تقدیر وتشکر:

بدینوسیله از اساتید و همکاران محترم بیمارستان مسیح دانشوری که در انجام این تحقیق کمک نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست مراجع:

1.Gerard J.Nau; Joan F.L.Richmond,Ann Schlesinger, *Human Macrophage activation programs induced by bacterial pathogens*, PNAS.Vol.99,No.3. 2001; PP: 1503-1508.

2. Kaufmann S, Paul van Helden P, Rubin E, and Warwick J. Britton; *Handbook of tuberculosis, immunology and cell biolog.* first ed. San Diego; Academic Press, 2008;PP: 374-375

3. Lenfant C; Nelson S. *Obstructive Pulmonary Disease*. In Lenfant C, ed. the series *"Lung Biology in Health and Disease,"* .New York; Marcel Dekker, 1991; PP : 1-21.

4. Ruehlmann J; Rong Xiang; Andreas G; Carrie S, Ralph A, Reisfeld. *Chemokine Gene Therapy Combines with Antibody-Cytokine Fusion* . Cancer Research 61 , 2001 ; PP: 8498-8503

5. Brooks F; Butel S. Morse A. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology*. 23nd ed. Boston; McGraw Hill, 2004; PP: 422-423

6. Jinquan T; Gang Z. *Cellular & Molecular Immunology* Wuhan University in China .Cancer Research 63 ; 2005; **2**(5): 343-349

7. Vlahov D, Margolick JB, Phair J, O'Brien TR, Lautenberger J, O'Brien SJ, Winkler CA. Tumor Necrosis Factor- α inducible promoter variant of interferon-γ accelerate CD4+ T Cell depletion in human immunodeficiency virus 1 infected individuals, National Cancer Institute , 2002, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12854077. (Accessed by 2001).

8. Lopez Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, Juan J.Vzuez,and Carmen Montiel. interferon-γ and Interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. 2003; http:// ajrccm.atsjournals.org/cgi/content/full/167/7/970. (Accessed by 2004).

9. Awomoyi AA, Nejentsev S, Richrdson J, Hull O , Kokh M, Podinovskaia J, McAdam,J M, Blackwell D ,KwiatkowskiM , Newport J. No

association between interferon-γ receptor-1 gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. 2003; www.ncbi.nlm.nih.gov › Journal List › Thorax › v.59(4); (Accessed Apr 2004).

10.Mirsaeidi SM, Houshmand M, Tabrsi P, Banoei MM, Zargari L , Amiri M, Mansouri SD, Sanati MH, Masjedi MR. Lack of association between interferon-γ receptor-1 polymorphism and pulmonary TB in Iranian population sample; 2005; *www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233916;* (Accessed 2006).

11. Martha M; de Oliveira; Jocilea C. S. de Silva; Josenef C; Lucia H. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the TNF-a (-238 / -308) gene among TB and non TB patients. January 2004 ; www.scielo.br/pdf/jbpneu/v30n4/en_v30n4a12.pdf. (Accessed April 2004).