مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۱/هفته اول بهمن ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۶

بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژنتیک IL33 و IL1RL1 و سطح سرمی IL-33 در بیماران مبتلا به آسم و Multiple Sclerosis

مریم احمدی[۱]، دکتر ناهید اسکندری[۲]، دکتر فرشته آل‌صاحب فصول[۲]، دکتر منصور صالحی[۳]، دکتر رامین قاسمی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر نقش مهم محور IL-33/IL-1RL1 (Interleukin-33/Interleukin-1 receptor-like 1) را در بیماری‌های خودایمنی و التهابی نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی و ارتباط پلی‌مورفیسم rs1342326 ژن IL-33 و پلی‌مورفیسم rs10204137 ژن IL-1RL1 و همچنین، سطح سرمی IL-33 در سه گروه افراد مبتلا به Multiple sclerosis (MS)، مبتلا به آسم و گروه شاهد بود.

روش‌ها: از ۱۴۰ بیمار مبتلا به آسم، ۱۴۰ بیمار مبتلا به MS و ۷۲ فرد سالم به عنوان گروه شاهد، نمونه‌گیری انجام شد. توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی دو پلی‌مورفیسم با استفاده از تکنیک HRM real-time PCR (High-resolution melting real-time polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت. سطح سرمی IL-33 با استفاده از کیت ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Boster) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: ارتباط معنی‌داری بین فراوانی پلی‌مورفیسم rs10204137 ژن IL-1RL1 و استعداد ابتلا به MS مشاهده شد (P = ۰/۰۱۷)؛ اما در افراد مبتلا به آسم، این ارتباط یافت نشد (P = ۰/۰۹۳). همچنین، ارتباط معنی‌داری بین فراوانی پلی‌مورفیسم rs1342326 ژن IL-33 در افراد مبتلا به آسم، مبتلایان به MS و نیز افراد سالم وجود نداشت (P = ۰/۵۸۰). سطح سرمی IL-33 در افراد مبتلا به MS و افراد مبتلا به آسم در مقایسه با افراد سالم مقادیر بالاتری را نشان داد (P = ۰/۰۲۰).

نتیجه‌گیری: میزان سرمی IL-33 در دو گروه بیماران مبتلا به آسم و مبتلا به MS، افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به افراد سالم داشت که نشان دهنده‌ی نقش این سایتوکاین در بیماری‌زایی این دو بیماری است.

واژگان کلیدی: Interleukin-33، Multiple sclerosis، آسم، پلی‌مورفیسم

ارجاع: احمدی مریم، اسکندری ناهید، آل‌صاحب فصول فرشته، صالحی منصور، قاسمی رامین. **بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژنتیک IL33 و IL1RL1 و سطح سرمی IL-33 در بیماران مبتلا به آسم و Multiple Sclerosis.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۱): ۲۱۰۱-۲۰۹۲

مقدمه

بیماری‌های ازدیاد حساسیت به علت پاسخ نامناسب سیستم ایمنی به آنتی‌ژن‌های خودی یا عوامل محیطی و اغلب بی‌ضرر ایجاد می‌شوند. بیماری‌های خود ایمن و آلرژیک جزء این اختلالات می‌باشند و بیماری Multiple sclerosis (MS) و آسم، به ترتیب از شایع‌ترین این بیماری‌ها محسوب می‌شوند. آسم یک بیماری التهابی مزمن و پیچیده‌ی مجاری تنفسی است که در حال حاضر، ۳۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان به آن مبتلا هستند (۱). شیوع بیماری آسم در ایران، از حد متوسط منطقه‌ای و جهانی بالاتر می‌باشد. بر اساس آخرین آمارها، میانگین شیوع در حدود ۱۰ درصد گزارش شده است (۲).

پاتوفیزیولوژی آسم آلرژیک، فرایندی پیچیده است که با فعال شدن سلول‌های Th2 (T helper2) اختصاصی آلرژن توسط سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (APCs یا Antigen-presenting cells) آغاز می‌گردد و در نتیجه با تکثیر این سلول‌ها، تولید سایتوکاین (IL-4 یا Interleukin-4، IL-5 و IL-13) توسط آن‌ها و تحریک سلول‌های B جهت تولید IgE (Immunoglobulin E) ادامه می‌یابد (۳).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان،اصفهان، ایران
۴- فوق تخصص آسم و آلرژی، کلینیک فوق تخصصی آسم و آلرژی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر ناهید اسکندری
Email: neskandari@med.mui.ac.ir

IL-33 جدیدترین عضو شناخته شده‌ی خانواده‌ی سایتوکاینی IL-1 است که توسط سلول‌ها و بافت‌های مختلف، مانند سلول‌های اپی‌تلیال برونشی و سلول‌های اندوتلیال سیستم اعصاب مرکزی تولید می‌شود (۴). پذیرنده‌ی IL-33، IL-1RL1 (Interleukin-1 receptor-like 1) عضوی از ابرخانواده‌ی پذیرنده‌ی Toll/IL-1 است. این پذیرنده هترودایمر و متشکل از ST2 و پروتئین کمک پذیرنده‌ی IL-1 (Interleukin-1 receptor-accessory protein یا IL-1RAcP) می‌باشد. اتصال IL-33 به ST2، باعث فعال شدن عوامل نسخه‌برداری NF-kB (Nuclear factor-kappa B) و MAPکینازها (Microtubule associated protein kinase) می‌شود (۵). این پذیرنده، بیان بالایی بر سطح ماست‌سل‌ها (Mast cells) دارد (۶) و یک نشانگر انتخابی برای سلول‌های Th2 به شمار می‌رود (۷).

شواهد تجربی بسیاری نقش IL-33 را در آسم نشان می‌دهد. تزریق IL-33 به موش‌های Wild-type از طریق تحریک تولید IL-4، IL-5 و IL-13 موجب القای AHR (Airway hyper responsiveness) و هایپرپلازی Gobletسل‌ها در ریه می‌شود (۸). آزمایش‌های انجام شده روی انسان نیز به نقش IL-33 در بیماری‌های آلرژیک اشاره می‌کنند. افزایش مقدار محلول ST2 در بیماران مبتلا به آسم مشاهده شده است که با شدت آسم و یا عود آن ارتباط دارد. سطوح بالایی از mRNAIL-33 (Messenger RNAIL-33) در بیوپسی ریوی بیماران مبتلا به آسم یافت شده و حتی مقادیر بالاتری از IL-33 در افراد مبتلا به آسم شدید در مقایسه با افراد سالم مشاهده شده است. سلول‌های ماهیچه‌ی صاف جدا شده از این بیماران، میزان بالاتری از IL-33 را بیان می‌کنند (۱۰-۹). IL-33 همچنین در سلول‌های اپی‌تلیال تنفسی ریه‌ی بیماران مبتلا به آسم متوسط تا شدید نیز افزایش می‌یابد (۱۱).

ژن IL-33 بر روی کروموزوم ۹ واقع شده و دارای ۸ اگزون می باشد. مطالعه‌ی گسترده‌ی ژنومی در جمعیت ایسلندی، ارتباط پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphisms یا SNPs) در ژن IL-33 را با ائوزینوفیل‌های خون نشان داده است (۱۲). این یافته با مطالعه‌ی بزرگ شاهد- موردی افراد مبتلا به آسم و افراد سالم ادامه یافت که ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن IL-33 و آسم نشان داد. مطالعات گسترده‌ی ژنومی در جمعیت اروپایی و آمریکای شمالی نیز IL-33 را به عنوان یکی از ژن‌های شاخص برای آسم معرفی کرد. هشت SNP در ژن IL-33 در ارتباط با فنوتیپ آسم گزارش شده است. همه‌ی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن IL-33 مرتبط با آسم در ناحیه‌ی '5 ژن و اینترون اول قرار دارند و تصور می‌شود، این جهش‌های تک نوکلئوتیدی نسخه‌برداری IL-33 را تحت تأثیر قرار می‌دهند و آل‌های مستعد کننده به آسم در ارتباط با افزایش تولید IL-33 می‌باشند (۱۴-۱۳).

ژن IL1RL1 بر روی کروموزوم 2q12 قرار دارد. این ژن برای اولین بار به عنوان یک ژن برگزیده برای درماتیت اتوپیک (Atopic dermatitis) توصیف شد. سپس، گروه‌های تحقیقاتی دیگری IL1RL1 را به عنوان لوکوس مستعد کننده‌ی آسم معرفی کردند. تا کنون، پانزده SNP در ژن IL1RL1 در رابطه با آسم گزارش شده است. این SNPها در سراسر ژن IL1RL1 پراکنده‌اند. SNPهای IL1RL1 مرتبط با آسم می‌توانند به تغییرات عملکردی مسیر IL-33/IL-1RL1 از طریق چندین مکانیسم مانند تغییر در سطح بیان از طریق جایگزینی در اسیدهای آمینه منجر شوند (۱۶-۱۵).

همچنین، نشان داده شده است که IL-33 دارای عملکردهای بیولوژیک مهمی در بیماری‌های خود ایمن از جمله آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis)، بیماری التهابی روده و MS می‌باشد (۱۷).

بیماری MS، یک بیماری دمیلینه‌ی التهابی مزمن سیستم اعصاب مرکزی است. بیش از دو میلیون نفر در جهان از این بیماری رنج می‌برند. شیوع بیماری در ایران ۶۰-۲۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر و در استان اصفهان ۷۳/۸ در ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد (۱۸). در این بیماری، سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی به غلاف میلین سلول‌های عصبی حمله می‌کند. بیماری MS تحت تأثیر عوامل مختلف ژنتیک و تغییرات محیطی ایجاد می‌شود (۱۹).

تا سال ۲۰۱۰ حدود شش مطالعه‌ی گسترده‌ی ژنومی (GWAS یا Genome-wide association study) در ارتباط با بیماری MS انجام شده که در آن‌ها چندین ژن به عنوان عوامل ژنتیک افزایش دهنده‌ی خطر ابتلا به MS شناسایی شده است (۲۰). IL-33 در آستروسیت‌های موشی بیان می‌شود و مشتق از سیستم اعصاب مرکزی (CNS یا Central nervous system) و از نظر عملکردی فعال می‌باشد. IL-33 می‌تواند بر فعالیت آستروسیت‌ها اثر بگذارد و در نهایت، موجب تکثیر میکروگلیاها و ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها مانند IL-13، IL-6 و MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) از این سلول‌ها گردد؛ این القا، توسط ماست‌سل‌های موجود در CNS با آزادسازی مدیاتورهای مختلف تقویت می‌شود (۲۱). افزون بر بیان IL-33 در مدل حیوانی بیماری Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)، این سایتوکاین در بیماریMS نیز القا می‌شود. سطح پروتئین و mRNAIL-33 در CNS و خون محیطی افراد مبتلا به MS افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند و درمان با IFN-β (Interferon beta) در این افراد سبب کاهش سطح بیان IL-33 می‌شود (۲۲).

علاوه بر این، مشاهده شده است که درمان با آنتی‌بادی مسدود کننده‌ی IL-33 در موش‌های دچار EAE سبب کاهش قابل توجهی در بیان IL-17، IFN-γ (Interferon gamma)، T-bet و RORγt

(Related orphan receptor gamma t) و افـزایش IL-10 و TGF-β (Transforming growth factor beta) در طناب نخاعی موش می‌گردد (۲۳). با توجه به جستجوها در پایگاه‌های اطلاعاتی، مطالعه‌ای در مورد پلی‌مورفیسم‌های IL-33 و IL1RL1 در رابطه با بیماری MS انجام نشده بود.

در این مطالعه دو بیماری وابسته به پاسخ‌های نامناسب سیستم ایمنی و هتروژن و در حال گسترش از نظر سطح سرمی IL-33 و دو SNP مربوط به ژن IL33 و ژن IL1RL1 مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه: ۱۴۰ بیمار مبتلا به آسم با میانگین سنی ۴۱ سال مراجعه کننده به کلینیک آسم و آلرژی بیمارستان امین اصفهان انتخاب شدند. آسم در این بیماران، بر اساس معیار جهانی آسم تشخیص داده شد و سابقه‌ی بیماری، معاینه‌ی فیزیکی و آزمایش عملکرد ریوی به شیوه‌ی استاندارد در همه‌ی افراد بررسی شد. زنان باردار و شیرده و مبتلایان به بیماری‌های انگلی از مطالعه خارج شدند. ۷۲ فرد سالم با میانگین سنی ۳۵ سال بدون سابقه‌ی ابتلا به بیماری‌های خود ایمنی، التهابی و عفونی و بدون سابقه‌ی پیوند اعضا که به سازمان انتقال خون برای اهدای خون مراجعه نموده بودند، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. ۱۴۰ بیمار مبتلا به Remitting-Relapsing MS (RRMS) غیر خویشاوند مراجعه کننده به بیمارستان الزهرای (س) اصفهان که بیماری آن‌ها بر اساس معیارهای McDonald و MRI (Magnetic resonance imaging) به تأیید متخصص نورولوژی رسیده بود، در مرحله‌ی RRMS با حداقل دو عود و بهبودی نسبی یا کامل با درجه‌ی ناتوانی (Expanded disability status scale یا EDSS) ۵-۰ به عنوان گروه بیمار مبتلا به MS با میانگین سنی ۳۰ سال انتخاب شدند. کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مطالعه را تأیید کرد و از همه‌ی افراد رضایت‌نامه‌ی کتبی اخذ گردید.

اندازه‌گیری سطح سرمی IL-33: ۴ cc خون جهت جداسازی سرم از همه‌ی افراد مورد مطالعه گرفته شد و سطح سرمی IL-33 با استفاده از کیت Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Boster, Fremont, CA) بر اساس دستورالعمل کیت اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA: از هر فرد، میزان ۲ cc خون در لوله‌های محتوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) گرفته شد و سپس DNA ژنومی با استفاده از کیت جداسازی DNA (Genet Bio, Korea) بر اساس دستورالعمل کیت استخراج گردید.

تعیین ژنوتیپ: با استفاده از روش HRM real time PCR (High-resolution melting real-time polymerase chain reaction) ژنوتیپ‌های rs1342326 و rs10204137 مطالعه شد. به منظور تکثیر اختصاصی نواحی مورد نظر برای هر SNP یک جفت پرایمر Forward و Reverse با نرم‌افزار پرایمر ۳ طراحی گردید (جدول ۱).

پرایمرها قبل از شروع آزمایش HRM با Traditional PCR مورد بررسی کیفی قرار گرفت تا از بروز Dimerisation پرایمرها و بد جفت شدن محصولات جلوگیری شود. محصولات تکثیر شده، حاصل از پرایمرها با روش PCR توسط ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد بررسی شدند (شکل ۱).

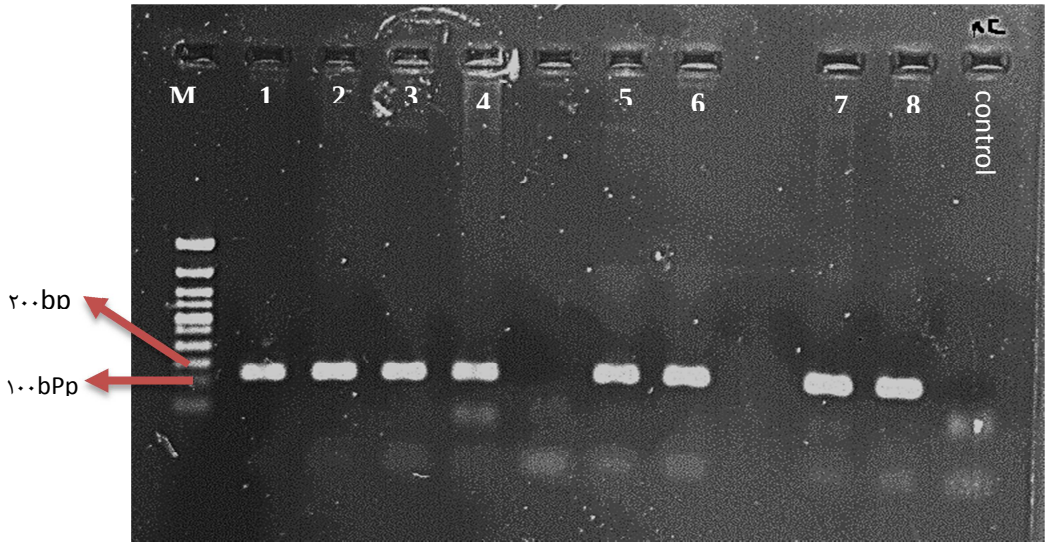
برای انجام واکنش Real time PCR و واکاوی HRM از دستگاه Corbette rotor gene 6000 و کیت dNTP mix (Deoxy nucleotide triphosphate) ۱۰ Mm با کیت Real time PCR (feldan-Canada) استفاده شد. PCR در حجم نهایی ۱۰ µl (شامل ۱ µl بافر 10X، ۰/۲۵ µl dNTP، ۰/۵ µl مخلوط پرایمر Forward و Reverse، ۰/۵ µl dye Evagreen، ۰/۱ µl آنزیم Taq polymerase و ۶/۶۵ dH_2O (Distilled Water) و ۱ µl DNA template) به میکروتیوب‌های ۰/۱ ml منتقل گردید و در ترموسایکلر ۷۲ چاهکی داخل دستگاه قرار گرفت.

به دنبال یک مرحله فعال‌سازی، آنزیم Taq DNA polymeras (موجود در Master mix) در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه واکنش PCR در ۴۵ چرخه‌ی سه مرحله‌ای انجام شد. در هر چرخه، مراحل Denaturation به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ °C و Anealing به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۶ °C و Extension به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ °C تکرار شد. پس از اتمام مراحل PCR، دما به ۶۵ °C کاهش یافت و هر ۲ ثانیه، ۰/۲ °C افزایش یافت و تغییرات مقدار فلورسنس توسط دستگاه ثبت شد. این روند تا رسیدن به دمای ۹۵ °C ادامه یافت. پس از انجام HRM، نتایج حاصل از آن با استفاده از نرم‌افزار Rotor gene 6000 آنالیز شد و نمودارهای HRM نرمالیز شده بر اساس مناطق نرمالیزاسیون زیر ترسیم شدند:

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تعیین ژنوتیپ

ژن	SNP	مکان	آلل	پرایمر
IL-33	rs1342326	5′UTR	A>C(5'-3') T>G(3'-5)	Forward: 5’-CCA ATC TTT TCT CAT GAA GAC ACC 3’ Reverse: 5’-CCT TTG ACC CTT CAG AGC AC 3’
IL-1RL1	Rs10204137	Coding, Nonsynonymous	A>G(5'-3')	Forward: 5’-ACG ACG CCA AGG TGA TAC TT- 3’ Reverse: 5’ –CCA CTT GAT GGT CCC CTG TA- 3’

SNP: Single nucleotide polymorphisms



شکل ۱. ارزیابی محصول PCR (Polymerase chain reaction) (amplicons). M: نشانگر DNA، ۱، ۲، ۳ و ۴: rs1342326 و ۵، ۶، ۷ و ۸: rs10204137

برای SNP rs1342326 مناطق 76.1-76.66 و 79.32-80.04 و برای SNP rs10204137 مناطق 83.7-84.86 و 87.76-88.95 نرمالیزه شد. سپس، هر یک از نمودارهای HRM مربوط به هر SNP به سه گروه تقسیم و از هر گروه، ۵ نمونه به صورت تصادفی انتخاب شد. بر روی این نمونه‌ها، PCR صورت گرفت و محصولات PCR جهت تعیین توالی ارسال شد. پس از تعیین توالی نمونه‌های با ژنوتیپ مشخص به عنوان مرجع داخلی، برای ایجاد نمودارهای استاندارد جهت طبقه‌بندی نمونه‌های با ژنوتیپ نامشخص استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تعیین فراوانی ژنوتیپ‌های SNP rs1342326 و rs10204137 در سه گروه بیماران مبتلا به آسم، مبتلا به MS و گروه افراد سالم، از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. تعادل Hardy–Weinberg با استفاده از آزمون Fisher's exact مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون χ^2 جهت مقایسه‌ی توزیع ژنوتیپ به کار رفت. ارتباط همبستگی پلی‌مورفیسم‌ها و سه گروه مورد مطالعه، با اندازه‌گیری تخمین شانس خطر ابتلا (Odds ratios یا OR) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد توضیح داده شد. همچنین، مقایسه‌ی میانگین سطح سرمی IL-33 در سه گروه با استفاده از آزمون One-way ANOVA صورت گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه، به بررسی توزیع فروانی دو پلی‌مورفیسم مربوط به ژن سایتوکاین IL-33 و پذیرنده‌ی آن یعنی IL-1RL1 پرداخته شد. پلی‌مورفیسم rs1342326 بر روی ژن IL-33 و پلی‌مورفیسم rs10203147 بر روی ژن IL-1RL1 در بین ۱۴۰ (۹۳ زن و ۴۷ مرد) بیمار مبتلا به آسم، ۱۴۰ (۸۰ زن و ۶۰ مرد) بیمار مبتلا به MS و ۷۰ فرد سالم (۳۹ زن و ۳۱ مرد) بررسی گردید (جدول ۲). اگر چه توزیع فراوانی جنس و میانگین سنی در سه گروه یکسان نبود، اما آزمون Independent t نشان داد که در هیچ یک از گروه‌ها، میانگین سطح سرمی IL-33 و فراوانی ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین، ضریب همبستگی Pearson نشان داد که در هیچ کدام از گروه‌ها بین سن و سطح سرمی IL-33 و فراوانی ژنوتیپ‌ها تفاوت چندانی نبود.

ژنوتیپ‌های مربوط به هر SNP به وسیله‌ی نمودارهای HRM با استفاده از نمونه‌های تعیین توالی شده به عنوان ژنوتیپ شاهد مشخص شد (شکل‌های ۲ و ۳). همه‌ی SNPهای مورد بررسی با هر دو گروه بیمار و شاهد، در تعادل Hardy-Weinberg بود ($P > ۰/۰۵۰$).

آزمون χ^2 نشان داد که توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs1342326 در سه گروه شامل بیماران مبتلا به آسم ($P = ۰/۲۷۰$)، بیماران مبتلا به MS ($P = ۰/۹۴$) و افراد سالم تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول‌های ۳ و ۴).

آزمون χ^2 نشان داد که توزیع فراوانی پلی‌مورفیسم rs10204137 در دو گروه بیماران مبتلا به MS و افراد سالم، به طور قابل ملاحظه‌ای معنی‌دار بوده است ($P = ۰/۰۱۷$). از سوی دیگر، توزیع فراوانی این پلی‌مورفیسم در گروه مبتلا به آسم در مقایسه با گروه سالم تفاوت معنی‌داری نداشت ($P = ۰/۹۳۰$) (جدول‌های ۵ و ۶).

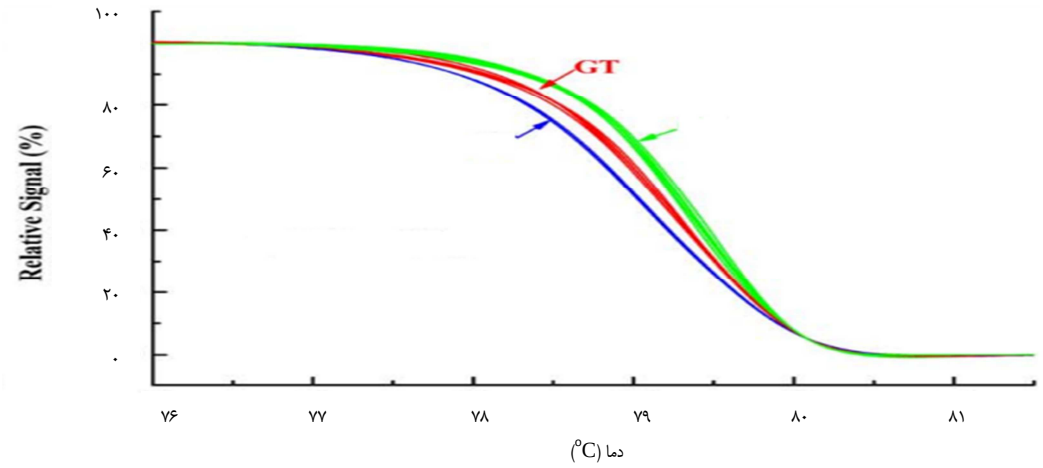
آزمون χ^2 نشان داد که فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت AGrs10204137 نسبت به ژنوتیپ‌های هموزیگوت AA و GG به

طور معنی‌داری در گروه بیماران مبتلا به MS بیشتر از گروه شاهد بود (P = ۰/۰۰۶، OR = ۲/۵). همچنین، توزیع فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت AG rs10204137 نسبت به ژنوتیپ‌های هموزیگوت AA و GG بین افراد مبتلا به آسم و گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت (P = ۰/۹۴۰، OR = ۰/۹۸۰) (جدول‌های ۷ و ۸).

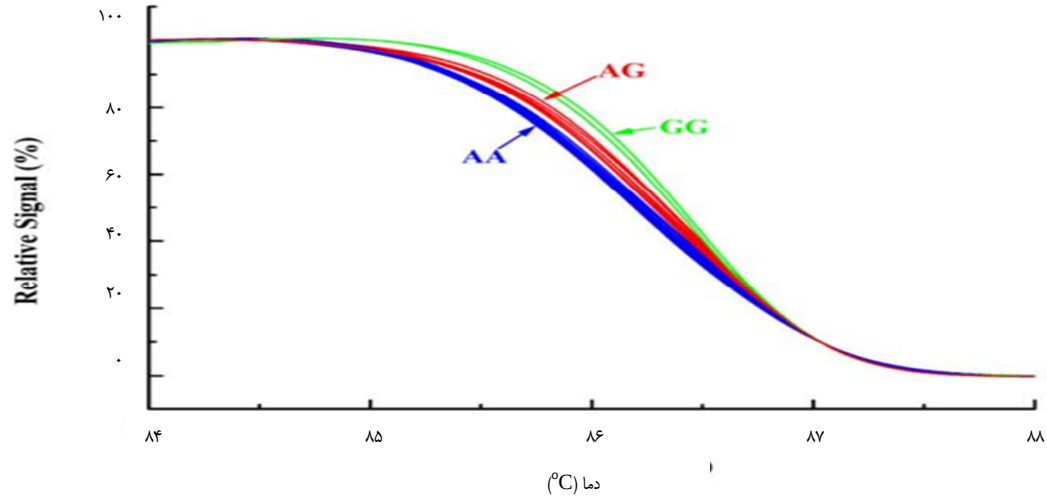
سطح سرمی پروتئین IL-33 در دو گروه بیمار با گروه افراد سالم مقایسه شد. در این ارزیابی، دو گروه بیمار یعنی مبتلایان به آسم (۳۷۶۷ pg/ml) و مبتلایان به MS (۳۷۱۲ pg/ml) سطوح بالاتری از این سایتوکاین را در مقایسه با گروه افراد سالم (۱۲۶۱ pg/ml) نشان داد (P = ۰/۰۲۰) (شکل ۴).

جدول ۲. خصوصیات جمعیت مورد مطالعه

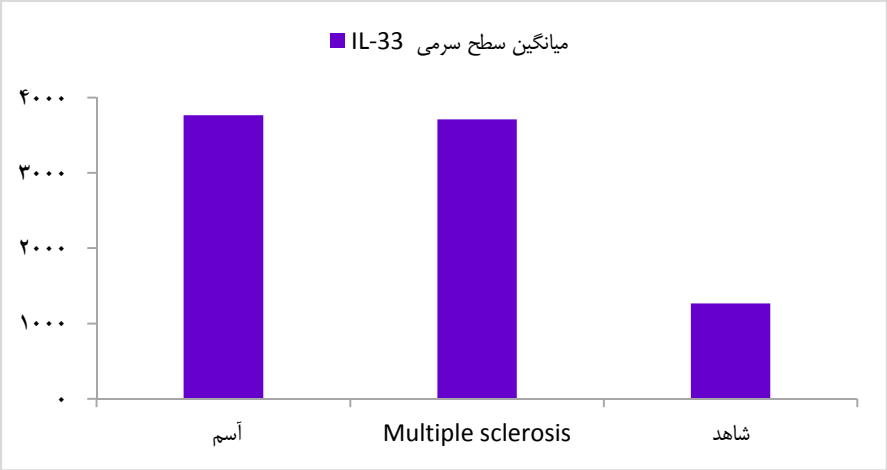
		مورد (مبتلایان به MS یا Multiple sclerosis)	مورد (مبتلایان به آسم)	شاهد	مقدار P
سن (میانگین ± انحراف معیار)		۸/۹ ± ۳۰/۷	۱۶/۷ ± ۴۱/۸	۹/۵ ± ۵۳/۳	۰/۰۰۱
جنس	مرد	۲۸ (۲۰/۰)	۴۷ (۳۳/۶)	۳۹ (۵۴/۲)	۰/۰۰۱
تعداد (درصد)	زن	۱۱۲ (۸۰/۰)	۹۳ (۶۶/۴)	۳۳ (۴۵/۸)	
جمع		۱۴۰	۱۴۰	۷۲	



شکل ۲. منحنی HRM (High-resolution melting) برای ژنوتیپ‌های مختلف rs1342326



شکل ۳. منحنی HRM (High-resolution melting) برای ژنوتیپ‌های مختلف rs10204137



شکل ۴. نمودار میانگین سطح سرمی **IL-33** (**Interleukin-33**) در سه گروه مبتلایان به آسم، مبتلایان به **MS** (**Multiple sclerosis**) و شاهد

جدول ۳. فراوانی ژنوتیپ‌های **rs1342326** در دو گروه بیماران مبتلا به **MS** (**Multiple sclerosis**) و شاهد

ژنوتیپ‌های rs1342326	گروه بیماران مبتلا به MS (Multiple sclerosis) تعداد درصد	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P
TT	۸۸ (۶۳/۰)	۳۹ (۵۴/۲)	۰/۹۴۰
GT	۴۱ (۲۹/۰)	۲۴ (۳۳/۳)	
GG	۱۱ (۸/۰)	۹ (۱۲/۵)	

جدول ۴. فراوانی ژنوتیپ‌های **rs1342326** در دو گروه بیماران مبتلا به آسم و شاهد

ژنوتیپ‌های rs1342326	گروه بیماران مبتلا به آسم تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P
TT	۹۱ (۶۵/۰)	۳۹ (۵۴/۲)	۰/۲۷۰
GT	۳۸ (۲۷/۱)	۲۴ (۳۳/۳)	
GG	۱۱ (۷/۹)	۹ (۱۲/۵)	

جدول ۵. فراوانی ژنوتیپ‌های **rs10204137** در دو گروه بیماران مبتلا به **MS** (**Multiple sclerosis**) و شاهد

ژنوتیپ‌های rs10204137	گروه بیماران مبتلا به MS تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P
AA	۱۰۷ (۷۶/۴)	۴۱ (۵۷/۰)	۰/۰۱۷
AG	۱۲ (۸/۶)	۱۴ (۱۹/۵)	
GG	۲۱ (۱۵/۰)	۹ (۲۳/۶)	

جدول ۶. فراوانی ژنوتیپ های **rs10204137** در دو گروه بیماران مبتلا به آسم و شاهد

ژنوتیپ‌های rs10204137	گروه بیماران مبتلا به آسم تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P
AA	۷۹ (۷۶/۴)	۴۱ (۵۷/۰)	۰/۹۳۰
AG	۲۵ (۸/۶)	۱۴ (۱۹/۵)	
GG	۳۶ (۱۵/۰)	۹ (۲۳/۶)	

جدول ۷. فراوانی ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و هموزیگوت **rs10204137** در دو گروه بیماران مبتلا به **MS** (**Multiple sclerosis**) و شاهد

ژنوتیپ	گروه بیماران مبتلا به MS تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P	OR (Odd ratio) (CI: ٪۹۵)
AA یا GG	۳۲ (۲۳/۲)	۳۱ (۴۳/۱)	۰/۰۰۶	۲/۴۹۸
AG	۱۰۸ (۷۶/۸)	۴۱ (۴۶/۹)		(۱/۲۹۲-۴/۸۳۲)

جدول ۸. فراوانی ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و هموزیگوت **rs10204137** در دو گروه بیماران مبتلا به آسم و شاهد

ژنوتیپ	گروه بیماران مبتلا به آسم تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P	OR (Odd ratio) (CI: ٪۹۵)
AA یا GG	۶۱ (۴۳/۶)	۳۱ (۴۳/۱)	۰/۹۴۰	۰/۹۷۹
AG	۷۹ (۵۶/۴)	۴۱ (۵۶/۹)		(۰/۵۵۲-۱/۷۳۸)

بحث

اگر چه اتیولوژی بیماری‌هایی نظیر آسم و MS به طور دقیق مشخص نشده است، اما تصور می‌شود این بیماری‌ها، در نتیجه‌ی بد تنظیمی و پاسخ نامناسب سیستم ایمنی به آنتی‌ژن‌های محیطی بی‌ضرر یا آنتی‌ژن‌های خودی با یک زمینه‌ی ژنتیک در فرد ایجاد می‌شوند. علاوه بر این، عدم تعادل بین مدیاتورهای پیش التهابی و ضد التهابی در پاتوژنز این بیماری‌ها نقش دارد. سایتوکاین‌ها، تنظیم کننده‌های کلیدی سیستم ایمنی محسوب می‌شوند.

IL-33 عضو خانواده‌ی سایتوکاینی IL-1 و پذیرنده‌ی آن ST2 یا IL-1RL1 می‌باشد. IL-33 بر روی بسیاری از سلول‌های ایمنی و غیر ایمنی تأثیر می‌گذارد. مسیر IL-33/IL-1RL1، نقش مهمی در دفاع میزبان و در اختلالات آلرژیک، خود ایمن و التهابی مزمن نظیر آسم، Rhinitis، Arthritis، MS و بیماری Alzheimer ایفا می‌کند (۲۴). IL-33 در القای سایتوکاین‌های Th2، به واسطه‌ی فعال شدن ماست‌سل‌ها و ائوزینوفیل‌ها نقش دارد؛ بنا بر این، در بیماری‌های آلرژیک نظیر آسم یکی از میانجی‌های کلیدی به شمار می رود. از آن جایی که ثابت شده است که سایتوکاین‌های Th2 و Th1 هر دو در بروز بیماری MS دخالت دارند (۲۶-۲۵)، ترشح IL-33 از آستروسیت‌ها و همچنین از خون محیطی در سیستم اعصاب مرکزی مبتلا به MS، ممکن است سبب برانگیختن پاسخ‌های Th2 شود (۲۷). ماست‌سل‌های فعال سلول‌های التهابی، نقش مهمی در این بیماری دارند (۲۸)؛ بنا بر این، افزایش بیان IL-33 در MS، نقش مهمی در فعال شدن ماست‌سل دارد که می‌تواند موجب ترشح مولکول‌های نوروتوکسیک، افزایش نفوذ پذیری سد خونی- مغزی و فعال شدن سلول‌های ایمنی و CNS شود (۲۹).

در این مطالعه، سطح سرمی IL-33 در این دو بیماری نسبت به گروه شاهد بررسی و مشاهده شد که IL-33 در سرم این دو بیماری به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر است؛ با توجه به مطالب پیش‌گفته، می‌توان این یافته را توجیه کرد.

مطالعات گسترده‌ی ژنومی انجام شده در سال‌های اخیر، بیش از ۱۰۰ جایگاه ژنی به عنوان لوکوس‌های مستعد کننده‌ی بیماری MS غیر از ژن‌های MHC معرفی کرده‌اند که بیشتر مربوط به ایمنی سلولی با واسطه‌ی سلول T می‌باشند. از سوی دیگر، سایر ژن‌های درگیر در تولید سایتوکاین‌ها به دلیل ماهیت التهابی بیماری MS مورد توجه قرار گرفته‌اند. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی IL-1، IL-4، IL-10 و TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha) به عنوان نشانگرهای مستعد کننده‌ی MS بررسی شده‌اند (۳۱-۳۰).

به نظر می‌رسد پژوهش حاضر، اولین مطالعه‌ی ارزیابی پلی‌مورفیسم ژن IL-33 و پذیرنده‌ی آن در رابطه با MS باشد که نشان داد پلی‌مورفیسم rs10204137 مربوط به ژن IL-1RL1 می‌تواند در بروز این بیماری نقش داشته باشد. همچنین، افرادی با ژنوتیپ هتروزیگوت AG برای این SNP شانس ابتلای بیشتری دارند. اگر چه در رابطه با پلی‌مورفیسم دیگر یعنی rs1342326 ژن IL-33، رابطه‌ی معنی‌داری با بروز بیماری در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد.

همچنین دو پلی مورفیسم rs1342326 و rs10204137 مربوط به ژن IL-33 و IL-1RL1 در بیماری آسم و افراد شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. اگر چه رابطه‌ی معنی‌داری بین این دو پلی‌مورفیسم و بروز بیماری آسم مشاهده نشد، اما با توجه به مطالعات مبنی بر نقش عملکردی این سایتوکاین در پاتوژنز بیماری آسم و ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها و پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی دیگر ژن IL-33 و IL-1RL1 با بروز این بیماری در جمعیت‌های مختلف، باید در جمعیت‌های بزرگ‌تری نیز بررسی شود.

در مجموع، یافته‌های مطالعه‌ی حاضر در این مطالعه، شواهد جدیدی مبنی بر نقش پلی‌مورفیسم‌ها در ژن پذیرنده‌ی IL-33،

IL-1RL1 در بیماری MS نشان داد. از سویی، با توجه به مطالعات اخیر که هم از نظر ژنتیک و هم عملکردی نشان دهنده‌ی نقش مسیر IL-33/IL-1RL1 در بیماری‌زایی آسم بوده است، لازم است مطالعه در حجم بزرگ‌تری انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۲۵۲۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. از تمامی افرادی که در اجرای این تحقیق یاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Bousquet J, Clark TJ, Hurd S, Khaltaev N, Lenfant C, O'byrne P, et al. GINA guidelines on asthma and beyond. Allergy 2007; 62(2): 102-12.
2. Heidarnia MA, Entezari A, Moein M, Mehrabi Y, Pourpak Z. Prevalence of asthma symptom in Iran: a meta-analysis. Pajouhesh Dar Pezeshki 2007; 31(3): 217-25. [In Persian].
3. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(3): 450-63.
4. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity 2005; 23(5): 479-90.
5. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. J Immunol 2007; 179(4): 2051-4.
6. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. J Exp Med 1998; 187(5): 787-94.
7. Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N, et al. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. Int Immunol 2008; 20(6): 791-800.
8. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, et al. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164(2): 277-81.
9. Prefontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ, et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. J Immunol 2009; 183(8): 5094-103.
10. Prefontaine D, Nadigel J, Chouiali F, Audusseau S, Semlali A, Chakir J, et al. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(3): 752-4.
11. Gudbjartsson DF, Bjornsdottir US, Halapi E, Helgadottir A, Sulem P, Jonsdottir GM, et al. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. Nat Genet 2009; 41(3): 342-7.
12. Zhang Y, Moffatt MF, Cookson WO. Genetic and genomic approaches to asthma: new insights for the origins. Curr Opin Pulm Med 2012; 18(1): 6-13.
13. Grotenboer NS, Ketelaar ME, Koppelman GH, Nawijn MC. Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. J Allergy Clin Immunol 2013; 131(3): 856-65.
14. Shimizu M, Matsuda A, Yanagisawa K, Hirota T, Akahoshi M, Inomata N, et al. Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. Hum Mol Genet 2005; 14(19): 2919-27.
15. Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M, Pan B, Appleton BA, Wiesmann C, et al. Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. Structure 2009; 17(10): 1398-410.
16. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. Nat Rev Immunol 2010; 10(2): 103-10.
17. Saadatnia M, Etemadifar M, Maghzi AH. Multiple sclerosis in Isfahan, Iran. Int Rev Neurobiol 2007; 79: 357-75.
18. Lassmann H. What drives disease in multiple sclerosis: Inflammation or neurodegeneration? Clin Exp Neuroimmunol 2010; 1(1): 2-11.
19. Oksenberg JR, Baranzini SE. Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? Nat Rev Neurol 2010; 6(8): 429-37.
20. Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. J Leukoc Biol 2008; 84(3): 631-43.
21. Christophi GP, Gruber RC, Panos M, Christophi RL, Jubelt B, Massa PT. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. Clin Immunol 2012; 142(3): 308-19.
22. Jiang HR, Milovanovic M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN-gamma production and inducing alternatively activated macrophages. Eur J Immunol 2012; 42(7): 1804-14.
23. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakae S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. Allergol Int 2010; 59(2): 143-60.
24. Christophi GP, Panos M, Hudson CA, Tsikkou C, Mihai C, Mejico LJ, et al. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis attenuates inflammatory gene expression through inducible activity of the phosphatase SHP-1.Clin Immunol 2009; 133(1): 27-44.
25. Christophi GP, Hudson CA, Panos M, Gruber RC, Massa PT. Modulation of macrophage infiltration and inflammatory activity by the phosphatase SHP-1 in virus-induced demyelinating disease. J Virol 2009; 83(2): 522-39.
26. Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, et al. Production and functions of IL-33 in

the central nervous system. Brain Res 2011; 1385: 8-17.
27. Sayed BA, Walker ME, Brown MA. Cutting edge: mast cells regulate disease severity in a relapsing-remitting model of multiple sclerosis. J Immunol 2011; 186(6): 3294-8.
28. Iikura M, Suto H, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T, Okayama Y, et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. Lab Invest 2007; 87(10): 971-8.
29. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature 2011; 476(7359): 214-9.
30. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kemppinen A, Cotsapas C, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet 2013; 45(11): 1353-60.
31. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. Nature 2012; 488(7412): 508-11..

Journal of Isfahan Medical School Received: 23.09.2015

Vol. 33, No. 361, 1st Week, February 2016 Accepted: 27.12.2015

The Relationship between the Genetic Polymorphisms of Interleukin-33 (IL-33) and Interleukin-1 Receptor-Like 1 (IL1R1) with the Levels of Interleukin-33 in Patients with Asthma and Multiple Sclerosis

Maryam Ahmadi[1], Nahid Eskandari PhD[2], Fereshteh Ale-Sahebfosoul PhD[2], Mansour Salehi PhD[3], Ramin Ghasemi MD[4]

Original Article

Abstract

Background: Recent evidence suggests that the interleukin-33/interleukin-1 receptor-like 1 (IL-33/IL1RL1) axis plays a critical role in autoimmune and inflammatory disorders; however, its mechanistic role in these diseases has not been clearly defined. The present study aimed to investigate the frequency of rs1342326 polymorphism of IL-33 gene and rs10204137 polymorphism of IL1RL1 gene with serum levels of IL-33 in multiple sclerosis (MS), asthma and healthy subjects In Isfahan Province, Iran.

Methods: Samples were taken from the patients with asthma (140) or multiple sclerosis (140) and healthy controls (72). Different genotypes of T/G or G/A polymorphisms were studied using the high-resolution melting real-time polymerase chain reaction (HRM real-time PCR) technique. Serum levels of IL-33 were measured via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Findings: There was not any relationship between the frequency of polymorphism rs10204137 of IL1RL1 gene and susceptibility to multiple sclerosis or asthma. There was no significant correlation between the frequency of rs1342326 polymorphism of IL-33 gene in healthy subjects compared to those with asthma or multiple sclerosis. Serum levels of IL-33 were higher than in patients with multiple sclerosis or asthma compared to healthy subjects.

Conclusion: Serum levels of IL-33 in the two groups of patient increased substantially compared to the controls.

Keywords: Interleukin-33 (IL-33), Multiple sclerosis, Asthma, Polymorphism

Citation: Ahmadi M, Eskandari N, Ale-Sahebfosoul F, Salehi M, Ghasemi R. **The Relationship between the Genetic Polymorphisms of Interleukin-33 (IL-33) and Interleukin-1 Receptor Like 1 (IL1R1) with the Levels of Interleukin-33 in Patients with Asthma and Multiple Sclerosis.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(361): 2092-101

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Asthma and Allergy Specialist, Isfahan Asthma and Allergy Clinic, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Nahid Eskandari PhD, Email: neskandari@med.mui.ac.ir