مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۳۰/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۶

میانگین بیان ژن IL-17 در نمونه‌ی خون محیطی بیماران دچار نارسایی ایمنی رایج متغیر

رضا یزدانی[۱]، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی[۲]، دکتر رویا شرکت[۳]، دکتر محسن مسجدی[۲]، دکتر حمید زرکش[۴]، دکتر محسن حسینی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول T_H17 با تولید IL-17 می‌تواند سبب افزایش تولید دو سایتوکین BAFF و APRIL شود که نقش مهمی در بقا و فعال شدن سلول B، و در نتیجه، پاسخ‌های ایمنی هومورال دارند. نارسایی ایمنی رایج متغیر (Common variable immunodeficiency یا CVID)، یکی از بیماری‌های نقص ایمنی اولیه می‌باشد که با کاهش سطح آنتی‌بادی‌ها (نارسایی ایمنی هومورال) همراه است. فراوانی افراد مبتلا به CVID در جمعیت‌های مختلف در محدوده‌ی ۱:۱۰۰۰۰ تا ۱:۵۰۰۰۰ گزارش شده است. هدف از این مطالعه، مقایسه‌ی میانگین بیان ژن IL-17 در بیماران مبتلا به CVID با افراد سالم بود.

روش‌ها: ابتدا ۲ میلی‌لیتر خون کامل از ۱۰ بیمار مبتلا به CVID و ۱۰ فرد سالم گرفته و سپس تمام mRNA موجود در این نمونه‌ها جدا شد. پس از ساختن cDNA از روی mRNA، میزان بیان ژن IL-17 را با استفاده از روش Real Time-PCR سنجیدیم.

یافته‌ها: میزان بیان ژن IL-17 در بیماران مبتلا به CVID نسبت به افراد شاهد کاهش یافت که البته این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P = ۰/۱۹۵$).

نتیجه‌گیری: در این پژوهش نشان دادیم که میزان بیان ژن IL-17 در خون بیماران مبتلا به CVID نسبت به افراد سالم کاهش داشت؛ این موضوع دلیلی بر نقص تولید این سایتوکین است و می‌تواند دلیل نارسایی پاسخ ایمنی هومورال در این افراد باشد.

واژگان کلیدی: نارسایی ایمنی رایج متغیر، سایتوکین، IL-17، IL-17، Real time-PCR

ارجاع: یزدانی رضا، گنجعلی خانی حاکمی مزدک، شرکت رویا، مسجدی محسن، زرکش حمید، حسینی محسن. **میانگین بیان ژن IL-17 در نمونه‌ی خون محیطی بیماران دچار نارسایی ایمنی رایج متغیر.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۰): ۳۶۳-۳۵۸

مقدمه

نارسایی ایمنی رایج متغیر (CVID یا Common variable immunodeficiency) مجموعه‌ای ناهمگون از ناهنجاری‌ها است که با کاهش سطح سرمی آنتی‌بادی‌ها، نارسایی در پاسخ آنتی‌بادی به عفونت‌ها یا واکسن‌ها و افزایش بروز عفونت‌ها

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۱۸۸۱۲۸ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری و مرکز تحقیقات نقص ایمنی اکتسابی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران
۴- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران
۵- دانشیار، گروه آمار حیاتی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رویا شرکت
Email: sherkat@med.mui.ac.ir

شناخته می‌شود. مشکل این بیماران، ناتوانی سلول‌های B در تمایز و تکثیر پس از تحریک آنتی‌ژنی می‌باشد. در این بیماران، میزان پلاسماسل و سلول‌های خاطره‌ای B به دلیل نقص‌های ژنتیکی خاصی در گیرنده‌های کمک محرک کاهش می‌یابد (۱).

تشخیص این بیماری زمانی مطرح می‌شود که احتمال سایر بیماری‌های نارسایی ایمنی اولیه رد شود. همچنین، زمانی تشخیص CVID برای بیماری مطرح می‌شود که کاهش سطح ایمونوگلوبولین‌های سرم را نتوان به مصرف دارو یا ابتلا به بیماری شناخته شده‌ی دیگری که به کمبود آنتی‌بادی ثانویه می‌انجامد، نسبت داد (۲). پس از کمبود انتخابی IgA، CVID شایع‌ترین نقص ایمنی اولیه در بالغین به شمار می‌آید که بیماران مبتلا به آن دارای تاریخچه‌ای از عفونت‌های راجعه در سطوح مخاطی به دلیل کاهش آنتی‌بادی سرمی هستند (۳). فراوانی افراد مبتلا به CVID در جمعیت‌های مختلف در محدوده‌ی ۱:۱۰۰۰۰ تا ۱:۵۰۰۰۰ گزارش شده است (۴).

در این بیماران IgG ممکن است به مقدار کمی کاهش یابد ولی اغلب، سطح IgA همراه با یا بدون IgM خیلی کمتر از حد طبیعی است (۵). از دیگر علایم CVID می‌توان به نارسایی پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی و افزایش آمادگی دچار شدن به عفونت‌های قارچی و باکتریال اشاره کرد. نام این بیماری، نشانگر تظاهرات و بیماری‌زایی متغیر آن است.

در سال ۲۰۰۵، سومین زیرمجموعه‌ی سلول‌های T helper به نام T_H17 شناخته شد (۷-۶). این سلول‌ها به طور مشخص سایتوکین IL-17 را تولید می‌کنند و به نظر می‌رسد، در مواردی که سلول‌های T_H1 و T_H2 ایمنی کاملی را در مقابل بعضی از عوامل بیماری‌زا (مانند باکتری‌های خارج سلولی و برخی قارچ‌ها) ایجاد نکرده‌اند، نقش داشته باشند (۸).

سلول‌های T_H17 علاوه بر IL-17 قادر به تولید سایتوکین‌های IL-6، IL-1β، IL-22 و TNF-α نیز هستند که همگی از جمله‌ی سایتوکین‌های پیش‌التهابی محسوب می‌شوند (۱۰-۹). IL-17 از طریق افزایش سایتوکین BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family) باعث بقای سلول‌های B و تقویت سیستم ایمنی هومورال می‌شود؛ به این ترتیب، سلول‌های T_H17 قادر به حفاظت علیه باکتری‌های خارج سلولی می‌باشند (۱۱) و به نظر می‌رسد نقص در این سلول‌ها می‌تواند باعث افزایش میزان ابتلا به باکتری‌های خارج سلولی و قارچ‌ها شود. میزان BAFF و APRIL (A proliferation-inducing ligand) توسط سایتوکین‌های پیش‌برنده‌ی التهابی نظیر IL-17 افزایش می‌یابد (۱۲). بدین ترتیب، ممکن است علاوه بر علل شناخته شده، بیماری CVID ناشی از نقص در سلول‌های T_H17 و یا علل ناشناخته دیگر نیز باشد.

این مطالعه با هدف مقایسه‌ی میانگین بیان ژن IL-17 در بیماران مبتلا به CVID با افراد سالم انجام پذیرفت.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، از ۱۰ بیمار CVID که به بیمارستان الزهرای (س) اصفهان مراجعه کرده بودند، پس از کسب رضایت‌نامه، نمونه‌گیری انجام شد.

خون کامل [همراه با ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)] افراد مورد

مطالعه در شرایط استاندارد (دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد) به آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان منتقل گردید؛ آن گاه، RNA نمونه‌های خون با استفاده از کیت GeneJET RNA Purification شرکت Fermentas و طبق دستورالعمل ارائه شده در کیت استخراج و با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت Fermentas به cDNA ترجمه شد.

در آخر، با استفاده از کیت SYBER Premix Ex Taq II شرکت Takara (ژاپن) و به روش Real-Time PCR، میزان بیان ژن IL-17 اندازه‌گیری شد و بیان آن در برابر بیان ژن ACTB بهینه‌سازی گردید. برای این کار از پرایمرهای آماده‌ی شرکت Qiagen استفاده شد. شایان ذکر است که تشخیص CVID به تأیید پزشک متخصص رسید.

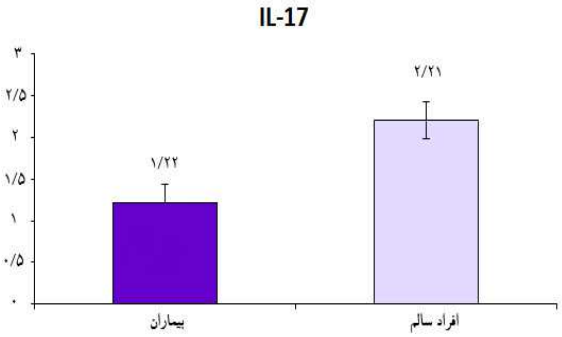
در این پژوهش، داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) با کمک آزمون آماری Independent-t مورد واکاوی قرار گرفت.

یافته‌ها

در این پژوهش، ۱۰ نفر از بیماران مبتلا به CVID مراجعه کننده به بیمارستان الزهرای (س) اصفهان مورد مطالعه قرار گرفتند. افراد مورد بررسی شامل ۵ نفر مرد (۵۰ درصد) و ۵ نفر زن (۵۰ درصد) بودند.

بر روی cDNA جدا شده از نمونه‌های خون بیماران CVID و افراد کنترل Real-time PCR صورت گرفت و بر اساس مقدار Ct، ΔCt و ΔΔCt، میزان بیان ژن IL-17 به عنوان ژن هدف و ACTB به عنوان ژن شاهد به روش سنجش نسبی (RQ یا Relative quantification) محاسبه گردید.

نتایج آنالیز داده‌ها مبنی بر بیان ژن سایتوکین IL-17 حاکی از آن بود که بیان ژن IL-17 در بیماران مبتلا به CVID نسبت به افراد شاهد به نزدیک به نصف کاهش داشت؛ هر چند این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P = ۰/۱۹۵) (شکل ۱).



شکل ۱. اندازه‌گیری بیان ژن IL-17 در بیماران CVID (Common variable immunodeficiency) و افراد سالم با روش qRT-PCR

بحث

هدف از مطالعه‌ی حاضر، اندازه‌گیری بیان ژن IL-17 در بیماران مبتلا به CVID و مقایسه‌ی آن با افراد سالم بود. CVID سندرمی است که با هیپوگاماگلوبولینمی (کاهش آنتی‌بادی در گردش خون) و ناتوانی در تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی همراه با تعداد طبیعی سلول‌های B محیطی مشخص می‌شود.

با وجود پیشرفت‌های ایجاد شده در زمینه شناخت ایمونوژنتیک بیماری‌های نقص اولیه‌ی ایمنی در سال‌های اخیر، هنوز نقص مولکولی و اساس ایمونوپاتوژنیک مشخصی برای بیماری CVID شرح داده نشده است (۱۳). به طور کلی، اساس آسیب شناختی این بیماری، عدم توانایی لنفوسیت‌های B

برای ترشح آنتی‌بادی به میزان کافی و یا در واقع، عدم تمایز لنفوسیت‌های B در مغز استخوان و یا بافت‌های لنفاوی محیطی است. با این وجود، نقص در مولکول‌هایی چون TACI (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13B)، ICOS (Inducible costimulatory molecule)، CD21، CD19، CD81، BAFF-R (B cell-activating factor receptor) و چند ژن دیگر، که در بقا و تمایز سلول‌های B به پلاسماسل نقش دارند، علت‌های احتمالی این بیماری در نظر گرفته می‌شود (۱۵-۱۴).

IL-17 سایتوکینی است که بیشتر توسط سلول‌های TH17 تولید می‌شود؛ ولی سلول‌های دیگری همچون نوتروفیل و سلول NK (Natural killer) نیز IL-17 تولید می‌کنند. IL-17 پل ارتباطی مهمی میان ایمنی اکتسابی با واسطه‌ی سلول T و سیستم ایمنی ذاتی، به ویژه اجزای التهابی پاسخ‌های ایمنی ذاتی، برقرار می‌کند. همچنین، این سایتوکین موجب افزایش نوتروفیل و تحریک تولید مواد ضدمیکروبی مانند دیفنسین‌ها می‌شود (۱۴).

در ارتباط با ایمنی هومورال، دو سایتوکین BAFF و APRIL قادر به فعال‌سازی دو پذیرنده‌ی TACI و BCMA (B-Cell maturation antigen) هستند که در مراحل پایانی فعال‌سازی سلول B و تمایز آن نقش دارند (۱۴). نقش BAFF ارسال پیام برای زنده ماندن و بلوغ سلول‌های B از طریق پذیرنده‌ی BAFF می‌باشد (۴). میزان BAFF و APRIL توسط سایتوکین‌های پیش‌برنده‌ی التهابی نظیر IL-17 افزایش می‌یابد (۱۲).

در پژوهش حاضر، کاهش بیان ژن سایتوکین IL-17 در نمونه‌ی خون بیماران CVID نسبت به افراد سالم دیده شد که البته این کاهش به نصف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

در یک مطالعه، فراوانی سلول‌های تولید کننده IL-17 در بیماران مبتلا به CVID دارای بیماری‌های خودایمنی یا بدون بیماری‌های خودایمنی مورد بررسی قرار گرفت و کاهش این سلول‌ها در بیماران گزارش شد (۱۵). یک مطالعه‌ی دیگر نیز نشان داد که بیماران مبتلا به CVID در مقایسه با بیماران مبتلا به Crohn افزایش در میزان سایتوکین‌های IL-12 و IFNγ داشتند ولی این افزایش در سایتوکین‌های IL-17 و IL-23 دیده نشد (۱۶). نتایج این مطالعات در ارتباط با IL-17، هم‌راستا با نتایج به دست آمده در بررسی حاضر می‌باشد. هرچند کاهش IL-17 در بررسی ما از نظر آماری معنی‌دار نبود که این یافته می‌تواند به دلیل کم بودن تعداد بیماران در این مطالعه باشد.

کاهش بیان ژن IL-17 در بیماران مبتلا به CVID در مقایسه با افراد شاهد، نشان دهنده‌ی کمبود سلول‌های TH17 و نارسایی در ایجاد پاسخ ایمنی مناسب در برابر عفونت‌های باکتریمی است و این موضوع دلیلی بر نقص تولید این سایتوکین و پاسخ ایمنی هومورال در این افراد می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که پشتیبانی مالی این پژوهش را به عهده گرفتند و کمال همکاری را با این پژوهش داشتند و همچنین از زحمات پرسنل گروه ایمونولوژی دانشکده‌ی پزشکی و آزمایشگاه مرکزی تشکر و سپاسگزاری فراوان می‌نماییم.

References

1. Kopecky O, Lukesova S. Genetic defects in common variable immunodeficiency. Int J Immunogenet 2007; 34(4): 225-9.
2. Pourpak Z, Aghamohammadi A, Etemad Saeid S, Heidarzadeh M, Sedighipour L. Relative frequency humoral primary immunodeficiency in identical patients with CVID in CVID patients. Tehran Univ Med J 2005; 63(5): 392-8.
3. Olerup O, Smith CI, Bjorkander J, Hammarstrom L. Shared HLA class II-associated genetic susceptibility and resistance, related to the HLA-DQB1 gene, in IgA deficiency and common variable immunodeficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(22): 10653-7.
4. Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. Clin Exp Immunol 2007; 149(3): 401-9.
5. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). Clin Immunol 1999; 93(3): 190-7.
6. Holm AM, Aukrust P, Damas JK, Muller F, Halvorsen B, Froland SS. Abnormal interleukin-7 function in common variable immunodeficiency. Blood 2005; 105(7): 2887-90.
7. Holm AM, Aukrust P, Aandahl EM, Muller F, Tasken K, Froland SS. Impaired secretion of IL-10 by T cells from patients with common variable immunodeficiency--involvement of protein kinase A type I. J Immunol 2003; 170(11): 5772-7.
8. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 2005; 6(11): 1123-32.
9. Vorechovsky I, Webster AD, Plebani A, Hammarstrom L. Genetic linkage of IgA deficiency to the major histocompatibility complex: evidence for allele segregation distortion, parent-of-origin penetrance differences, and the role of anti-IgA antibodies in disease predisposition. Am J Hum Genet 1999; 64(4): 1096-109.
10. Mechanic LJ, Dikman S, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. Ann Intern Med 1997; 127(8 Pt 1): 613-7.
11. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. Nat Immunol 2007; 8(9): 950-7.
12. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. Nat Immunol 2009; 10(7): 778-85.
13. Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo LD. Primary immunodeficiency diseases: Definition, diagnosis, and management. Berlin, Germany: Springer; 2008.
14. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai Sh. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2011.
15. Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, Melo AC, Pedro E, Barbosa MP, et al. Primary B-cell deficiencies reveal a link between human IL-17-producing CD4 T-cell homeostasis and B-cell differentiation. PLoS One 2011; 6(8): e22848.
16. Mannon PJ, Fuss IJ, Dill S, Friend J, Groden C, Hornung R, et al. Excess IL-12 but not IL-23 accompanies the inflammatory bowel disease associated with common variable immunodeficiency. Gastroenterology 2006; 131(3): 748-56.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 04.01.2013
Vol. 31, No. 230, 4th Week, May 2013
Accepted: 16.03.2013

Evaluation of IL-17 Gene Expression in the Peripheral Blood of Patients with Common Variable Immunodeficiency

Reza Yazdani[1], Mazdak Ganjalikhani Hakemi PhD[2], Roya Sherkat MD[3], Mohsen Masjedi PhD[2], Hamid Zarkesh PhD[4], Mohsen Hosseini PhD[5]

Original Article

Abstract

Background: Producing IL-17, Th17 cells induce BAFF and APRIL, two important mediators for B-cell survival and activation. Common variable immunodeficiency (CVID) is a group of many primary immunodeficiency diseases with a common set of features (including hypo-gammaglobulinemia) and different underlying causes. The prevalence of CVID is 1 to 50,000. Hence, the aim of this study was to measure IL-17 gene expression in peripheral blood of patients with CVID.

Methods: Total mRNA extracted from whole blood samples of 10 patients with CVID and 10 normal controls; then, IL-17 gene was measured using qRT-PCR.

Findings: There was a slight decrease in transcript levels of IL-17 in patients with CVID, even though, it was not statistically significant (P = 0.195).

Conclusion: We showed that IL-17 is decreased in patients with CVID and this could be an explanation for their humoral immunity response insufficiencies. Absence of statistical significance in this IL-17 reduction may be due to our sample size and increasing the number of samples may result in statistical significance of this in future studies.

Keywords: Common variable immunodeficiency**,** Cytokin, IL-17, Th17, Real time-PCR

Citation: Yazdani R, Ganjalikhani Hakemi M, Sherkat R, Masjedi M, Zarkesh H, Hosseini M. **Evaluation of IL-17 Gene Expression in the Peripheral Blood of Patients with Common Variable Immunodeficiency.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(230): 358-63

* This paper is derived from a MSc thesis No. 188128 in Isfahan University of Medical Sciences.

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, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center AND Acquired Immunodeficiency Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Associate Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Roya Sherkat MD, Email: sherkat@med.mui.ac.ir