مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۱٤/هفته سوم بهمن ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳

بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم ژن TIM-۳ در بیماران مبتلا به آسم و ارتباط آن با سطح ایمونوگلوبین E تام سرمی این بیماران در شهر اصفهان

مریم صدری[۱]، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی[۲]، دکتر رسول صالحی[۳]،
دکتر رامین قاسمی[۴]، صدیقه رستاقی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آسم نوعی بیماری التهابی مزمن مجاری هوایی است و یک بیماری چند عاملی محسوب می‌شود که ژن‌های متعددی در ایجاد و تشدید آن شناسایی شده است. از آن جمله، خانواده‌ی ژن TIM (T-cell immunoglobulin mucin) است که بر روی لنفوسیت‌های T بیان می‌شود و جایگاه ژنی آن بر روی کروموزوم شماره‌ی ۵ واقع شده است. یکی از اعضای این خانواده، مولکول TIM-۳ است که در سطح لنفوسیت‌های Th۱ (T-Helper-1) بیان می‌شود. این مولکول در همکاری با Galectin-9 (لیگاند TIM-۳) و سامان‌دهی به پاسخ‌های Th۱، نقش مهمی در توسعه‌ی بیماری‌های آلرژیک دارد. پلی‌مورفیسم‌های تأثیرگذار بر ساختار و عملکرد مولکول TIM-۳ ممکن است در آمادگی دچار شدن به بیماری‌های آلرژیک نقش مهمی را ایفا کنند. در این مطالعه، ارتباط پلی‌مورفیسم ۴۲۵۹G>T با میزان آمادگی دچار شدن به آسم و سطح ایمونوگلبولین E تام سرمی بررسی شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، پلی‌مورفیسم ۴۲۵۹G>T ژن TIM-۳ در ۲۰۹ بیمار مبتلا به آسم و ۲۰۰ نفر گروه شاهد، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP (Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، ارتباط این پلی‌مورفیسم با ایمونوگلوبولین E تام نمونه‌ی سرم افراد نیز با استفاده از روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) انجام شد. از آزمون χ^2 برای بررسی فراوانی ژنوتیپ افراد و رابطه‌ی آن با میزان ایمونوگلوبولین E تام سرم و بیماری آسم استفاده گردید. $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار محسوب شد.

یافته‌ها: فراوانی پلی‌مورفیسم ژن TIM-۳ بین دو گروه مبتلا به آسم و شاهد متفاوت بود و ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم و خطر ابتلا به آسم مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که رابطه‌ی معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم ۴۲۵۹G>T ژن TIM-۳ با بیماری آسم وجود دارد. از این رو، این پلی‌مورفیسم ممکن است بر عملکرد اتصال به لیگاند مولکولی TIM-۳ اثرگذار باشد.

واژگان کلیدی: آسم، پلی‌مورفیسم، ژن T-cell immunoglobulin mucin-۳ (TIM-۳)

ارجاع: صدری مریم، گنجعلی خانی حاکمی مزدک، صالحی رسول، قاسمی رامین، رستاقی صدیقه. **بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم ژن TIM-۳ در بیماران مبتلا به آسم و ارتباط آن با سطح ایمونوگلوبین E تام سرمی این بیماران در شهر اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۱۴): ۲۲۰۱-۲۱۹۳

۱- کارشناس ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی سلولی و مولکولی و گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- فوق تخصص آسم، آلرژی و ایمنی بالینی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی
Email: mghakemi@med.mui.ac.ir

مقدمه

آسم یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن در جهان است که به علت التهاب مجاری تنفسی و برونش ایجاد می‌شود (۱). در حال حاضر، میزان شیوع این بیماری در جهان بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization یا WHO) ۳۰۰ میلیون نفر برآورد گردیده است و در نقاط مختلف، دارای شیوع متفاوتی از ۱۸-۱ درصد می‌باشد؛ این بیماری سالانه ۲۵۰ هزار مرگ در سراسر جهان را باعث می‌شود (۳-۲). کشورهای در حال توسعه نیز با افزایش روند شهری شدن شیوع در حال افزایشی از این بیماری را نشان می‌دهند. پیش‌بینی می‌شود تلفات آسم در دنیا تا سال ۲۰۲۰ به ۱۰ میلیون نفر خواهد رسید که ۹۰ درصد این جمعیت مربوط به کشورهای جهان سوم است (۴).

سهم بیماران مبتلا به آسم در ایران (با حدود ۷۰ میلیون نفر جمعیت) حدود ۳/۵ میلیون نفر تخمین زده می‌شود. نشانه‌های بالینی آسم شامل خس‌خس، تنگی نفس، گرفتگی قفسه‌ی سینه و سرفه می‌باشد. بیماری آسم یک بیماری هتروژن است که در ایجاد و ادامه ی روند آن، عوامل محیطی، ژنتیک، تماس های شغلی و آلرژن‌ها دخالت دارند. مشخصه‌ی ایمونولوژیک این بیماری، افزایش تولید اینترلوکین ۴ و ۵ و ایمونوگلوبولین E و فراخوانی ماست‌سل‌ها (Mast cells)، ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها به ناحیه‌ی آلرژیک و افزایش شمار لنفوسیت‌های Th۲ (T-Helper-2) است (۵). لنفوسیت‌های Th بکر، تحت تأثیر عواملی مانند نوع آنتی‌ژن، الگوی سایتوکاینی، فاکتورهای نسخه‌برداری و مسیرهای انتقال پیام به زیرگروه Th۱ و Th۲ و یا دیگر زیرگروه‌ها تمایز پیدا می‌کنند. تعادل میان لنفوسیت‌های Th۲ و Th۱ در پاسخ ایمنی به پاتوژن‌ها، آنتی‌ژن‌های توموری و آلرژن‌ها اهمیت زیادی دارد. برتری جمعیت سلول‌های Th۲ از بیماری‌های خودایمنی برانگیخته شده توسط سلول‌های Th۱ جلوگیری می‌کند و برتری جمعیت سلول‌های Th۱ نیز می‌تواند مانع ایجاد بیماری‌های آلرژیک و آسم شود (۶).

شیوع بالای بیماری آسم و ناتوانی روش‌های پزشکی در مهار کامل این بیماری، سیل گسترده‌ی مطالعات جدید را به سوی ژنتیک آسم سرازیر نموده است. از دیدگاه ژنتیک، آمادگی ابتلا به آسم با چندین جایگاه ژنی از جمله کروموزوم ۵، ۶، ۱۱، ۱۲ و ۱۴ در ارتباط می باشد. از این میان، ارتباط بین کروموزوم ۵ و بیماری آسم در چندین مطالعه در جمعیت های مختلف به طور مکرر مشاهده شده است (۷). از جمله ژن‌هایی که در این ناحیه‌ی کروموزومی واقع شده‌اند و نقش آن‌ها در سال‌های اخیر در بروز بیماری های مختلف مانند بیماری های آلرژیک و خودایمنی مورد توجه قرار گرفته است، خانواده ی ژن TIM (T-cell immunoglobulin mucin) می‌باشد که در سال ۲۰۰۱، با استفاده از مدل موشی کاندیدا آسم و مطالعات ژنتیکی شناسایی گردید (۹-۸).

خانواده‌ی ژن TIM در انسان گلیکوپروتئین های سطحی نوع یک با موتیف‌های ساختاری مشترک و عملکرد متفاوتی را رمزدهی می‌کند که بر روی لنفوسیت‌های T بیان می‌شود و شامل ۳ عضو (TIM-4، TIM-3 و TIM-1) بر روی کروموزوم شماره‌ی ۵ انسان است که این جایگاه نیز شامل ژن‌های مهم در پاسخ‌های ایمنی وابسته به Th۲ و

متشکل از اینترلوکین ۴، ۵ و ۱۳ می‌باشد (۱۰).

TIM-۳ یک عضو از خانواده‌ی ژنی TIM می‌باشد که به عنوان شناسه‌ی لنفوسیت‌های Th۱ شناخته می‌شود و به میزان زیادی در مراحل انتهایی تمایز لنفوسیت‌های Th۱ و نه لنفوسیت‌های Th۲ و T بکر بیان می‌شود (۱۱). لیگاند مولکول TIM-۳، فسفاتیدیل سرین و Galectine-9 است. Galectine-9 مولکول محلولی می‌باشد که به طور گسترده‌ای در سلول‌های ایمنی بیان می‌شود و بیان آن تحت تأثیر اینترفرون گاما تولید شده از سلول‌های Th۱ افزایش می‌یابد (۱۲-۱۰). همکاری TIM-۳ با Galectin-9 باعث برانگیختن آپوپتوز در لنفوسیت‌های Th۱ می‌شود و یک تنظیم کننده‌ی منفی برای پاسخ ایمنی ایجاد شده توسط Th۱ است. بدین ترتیب، این مولکول نقش خود را در کنترل پاسخ‌های ایمنی سلولی ایفا می‌کند (۱۳).

میزان بیان Galectine-9 سلول‌های اپی‌تلیال ریه در مدل موشی آسم افزایش می‌یابد و با افزایش میزان سایتوکاین‌های Th۲ و افزایش شمار سلول‌ها به خصوص ائوزینوفیل‌ها در ریه همراه است. استفاده از آنتی بادی علیه TIM-۳ با کاهش تولید سایتوکاین های Th۲ و رسوخ ائوزینوفیل‌ها، تأیید کننده‌ی نقش این مولکول در بیماری آسم می باشد. پاک سازی کارآمد اجسام آپوپتوتیک از ریه نقش مهمی در ممانعت از توسعه‌ی بیماری های آلرژیک دارد (۱۴). TIM-۳ در اتصال با لیگاند خود (فسفاتیدیل سرین سطح سلول های آپوپتوز شده) در کاهش التهابات بیماری آسم دخیل است. بنابراین، TIM-۳ مولکول تنظیم کننده‌ی مهمی به شمار می‌رود که با تغییر نسبت لنفوسیت‌های Th۱/Th۲، در ایجاد بیماری‌های آلرژیک وابسته به Th۲ دخیل است (۱۵-۷).

پلی مورفیسم های ژن TIM-۳ در پیوند TIM-۳ با لیگاندش مؤثر می باشد و ممکن است با تغییر نسبت لنفوسیت‌های Th۱/Th۲ و انحراف به سمت Th۲ و یا تجمع سلول‌های آپوپتوز شده‌ی در ریه و افزایش التهاب در ایجاد بیماری آسم تأثیرگذار باشد. عوامل ژنتیک نیز در تعیین سطح ایمونوگلبولین E (Immunoglobulin E) تام و اختصاصی سرمی (کلید اصلی زمینه سازی آسم) تأثیرگذار است. شواهدی مبتنی بر ارتباط بین کروموزوم 5q و ایمونوگلبولین E سرمی وجود دارد (۷).

با توجه به مطالب بیان شده، هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسم ۴۲۵۹G>T با بیماری آسم در یک جمعیت ایرانی بود.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر به صورت یک بررسی مورد-شاهدی انجام شد. گروه شاهد شامل ۲۰۹ فرد عادی بود که هیچ گونه علایم یا سابقه‌ی خانوادگی آلرژی، آسم، رینیت آلرژیک یا سایر بیماری های آلرژیک را نداشتند. این افراد به صورت داوطلبانه و با آگاهی از مفاد طرح انتخاب شدند و از نظر سن و جنس با گروه بیماران هماهنگ بودند. گروه مورد را ۲۰۰ نفر از بیماران مبتلا به آسم مراجعه کننده به بیمارستان امین اصفهان تشکیل دادند. تشخیص آسم بر اساس معیارهای GINA (Global Initiative for Asthma) توسط پزشک متخصص صورت گرفت. اهداف طرح برای همه ی بیماران گروه شاهد و مورد توضیح داده شد و رضایت‌نامه‌ی کامل از آنان جهت شرکت در طرح و مجوز اخلاقی از کمیته‌ی اخلاق در پژوهش

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان اخذ گردید. همچنین، اطلاعات مربوط به سن بیمار، مدت ابتلا به بیماری، سابقه‌ی خانوادگی، علایم و شکایات از بیماری در پرسش‌نامه‌ی از پیش تنظیم شده ثبت شد.

۵ میلی‌لیتر خون محیطی از گروه‌های مورد و شاهد در فاصله‌ی زمانی آبان ماه تا اسفند ماه سال ۱۳۹۲ به منظور استخراج DNA (Deoxyribonucleic acid) و اندازه‌گیری سطح ایمونوگلبولین E تام گرفته شد که ۱/۵ میلی لیتر آن در لوله‌های استریل حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) جهت استخراج DNA سلولی و باقی مانده جهت گرفتن سرم برای اندازه گیری میزان سطح ایمونوگلبولین E تام مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری سطح ایمونوگلبولین E تام افراد بیمار و شاهد به روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) و با استفاده از کیت (Euroimmun, Germany) انجام شد. DNA ژنومی نمونه‌های خون از سلول‌های لکوسیتی با استفاده از کیت استخراج DNA (Feldan, Canada) طبق پروتکل موجود در کیت، از خون کامل استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش الکتروفورز و استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و DNA به دست آمده تا زمان انجام مراحل بعدی مطالعه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شد.

جهت بررسی پلی‌مورفیسم مورد نظر و مشخص شدن ژنوتیپ افراد مورد مطالعه، یک قطعه شامل ۶۴۹ جفت باز در ناحیه ی رمزگذار ژن TIM-۳ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

توالی رفت ´3´5:**GGGAAGGTGATGGGCTTT**

توالی برگشت ´5 :**GGCAGGTTTGGAAGCTGA**´3

که با برنامه‌ی Gene runner طراحی شده بود، تکثیر گردید. سپس، محصولات PCR (Polymerase chain reaction) از نظر وجود پلی‌مورفیسم ۴۲۵۹G>T با روش RFLP-PCR (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) و با استفاده از آنزیم برشی Pst1 که آلل حاوی پلی مورفیسم را برش می‌دهد، مورد بررسی قرار گرفت.

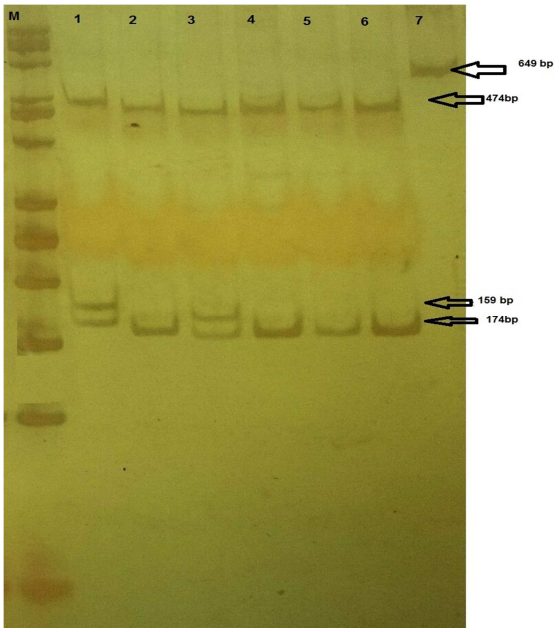
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، دارای ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۹ میکرولیتر کلرید منیزیم ($Mgcl_2$)، ۰/۶ میکرولیتر dNTP (Deoxynucleotide triphosphates)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۰/۶ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase، ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی (۲ نانوگرم) و ۱۷/۴ میکرولیتر آب مقطر استریل و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Ependorf, Germany) انجام شد. برنامه‌ی زمانی- دمایی بهینه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر ژن TIM-۳ به صورت واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس، ۳۵ چرخه ی تغییرات دمایی به ترتیب زیر تکرار گردید:

- دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشته‌سازی دو رشته‌ی DNA
- دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال پرایمرها
- دمای ۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه جهت طویل‌سازی

جهت اطمینان از تکثیر موفق ناحیه‌ی مورد نظر و صحت آن، ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱/۵ میکرولیتر Loading dye مخلوط و بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید. به منظور انجام روش RFLP نیز ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR توسط یک واحد از آنزیم Pst1 (تهیه شده از شرکت فرمنتاز) و طبق پروتکل همراه آنزیم به مدت ۹۰ دقیقه انکوباسیون گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR هضم شده به مدت سه ساعت با ولتاژ ۷۰ بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز گردید و سپس با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد.

در صورت تغییر نوکلئوتید T به G در جایگاه ۴۲۵۹، جایگاه برش برای آنزیم Pst1 ایجاد می شود و توالی مورد نظر برش خورده، منجر به ایجاد سه ژنوتیپ مختلف می‌گردد که شامل ژنوتیپ TT-/- باند ۱۶، ۱۵۹ و ۴۷۴، ژنوتیپ GT-/+ باند ۱۵۹، ۱۷۴ و ۴۷۴ و ژنوتیپ GG+/+ باند ۴۷۴ و ۱۷۵ می باشد (علامت + و - نشانگر حضور و عدم حضور جایگاه برش است). قطعه‌ی ۱۶ به علت اندازه‌ی کوچک از ژل خارج می‌شود (شکل ۱).

به منظور بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی در گروه مورد و شاهد، آزمون آماری χ^2 مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، OR (Odds ratio) با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد جهت تخمین ارتباط بین ژنوتیپ های مختلف پلی مورفیسم ۴۲۵۹G>T و سطح ایمونوگلبولین E تام سرم با خطر ابتلا به بیماری محاسبه گردید. در همه ی محاسبات، $P < ۰/۰۵$ به عنوان مشخصه‌ی ارتباط معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها با بیماری آسم در نظر گرفته شد.



شکل ۱. آنالیز RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ژن TIM-۳ (T-cell immunoglobulin-3) با استفاده از آنزیم Pst1
ردیف M مارکر ۵۰bp: ردیف ۱و ۳ دارای ژنوتیپ هتروزیگوت (AC: ۱۵۹، ۱۷۵، ۴۷۴) و ردیف ۲، ۴، ۵ و ۶ دارای ژنوتیپ هموزیگوت (AA: ۱۵۹، ۴۷۴)

یافته‌ها

یافته های آزمایشگاهی و داده های مربوط به گروه مورد و شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است. هیچ تفاوت معنی‌داری بین سن و جنس گروه‌ها وجود نداشت که و نشانگر همسان‌سازی متغیرهای بین دو گروه می‌باشد. سطح ایمونوگلبولین E و تعداد ائوزینوفیل ها در گروه مورد و شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

فراوانی ژنوتیپ GT در گروه مورد ۳۳ درصد (۶۹ نفر) و در گروه شاهد ۱۹ درصد (۳۷ نفر) به دست آمد. بر اساس یافته‌ها، ژنوتیپ TT در گروه مورد دارای فراوانی ۶۷ درصد (۱۴۰ نفر) و در گروه شاهد دارای فراوانی ۸۱ درصد (۱۶۴ نفر) بود

جدول ۱. مشخصات جمعیت مورد مطالعه

متغیر	شاهد (۲۰۰ نفر)	مورد (۲۰۹ نفر)	مقدار P
سن (سال) (میانگین ± انحراف استاندارد)	۴۱/۹۶ ± ۴۱/۱۱	۴۳/۱۷ ± ۱۴/۸۹	۰/۳۹۹
جنسیت [تعداد (درصد)]			
زن	۱۲۰ (۶۰)	۱۴۰ (۶۷)	۰/۱۴۲
مرد	۸۰ (۴۰)	۶۶ (۳۳)	
ائوزینوفیل (تعداد در میلی‌لیتر) (میانگین ± انحراف استاندارد)	۰/۰۸۵۱ ± ۰/۰۵	۰/۲۳۶۰ ± ۰/۲۶	۰/۰۰۱
وضعیت مصرف سیگار [تعداد (درصد)]			
خیر	۱۹۲ (۹۶/۰)	۲۰۲ (۹۶/۷)	۰/۷۲۶
بلی	۸ (۴/۰)	۷ (۳/۳)	
سطح ایمونوگلبولین E سرمی (U/ml) (میانگین ± انحراف استاندارد)	۰/۷۵ ± ۰/۳۸	۱/۷۴ ± ۰/۶۵	۰/۰۰۱

[OR = ۲/۱۸۵، RR = ۱/۴۱۳۴ (Relative Risk)]. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها حاکی از آن بود که تفاوت معنی‌داری در فراوانی این دو ژنوتیپ بین افراد سالم و بیمار وجود داشت.

سطح ایمونوگلبولین E تام سرمی در ژنوتیپ TT برابر با ۰/۶۰۸ ± ۱/۵۷۹ و در ژنوتیپ GT برابر با ۰/۶۵۲ ± ۲/۰۵۰ واحد بر میلی‌لیتر بود. بر این اساس، هیچ گونه ارتباط آماری معنی‌داری بین سطح ایمونوگلبولین E تام سرمی و ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (P > ۰/۰۵).

بحث

آسم یک بیماری چند عاملی است که هر دو عامل ژنتیک و محیط را در آمادگی ایجاد و بیماری‌زایی آن دخیل می‌دانند (۱۶). یکی از ژن‌های خانواده‌ی ژنی TIM، TIM-۳ می‌باشد که به عنوان پذیرنده‌ی سلولی ویروس هپاتیت A نیز شناخته می شود. TIM-۳ در بالاترین میزان تنها بر سطح سلول های Th۱ وجود دارد و از طریق برانگیختن آپوپتوز در این لنفوسیت‌ها، نقشی اساسی در تنظیم پاسخ‌های وابسته به Th۱ و فعال‌سازی ماکروفاژها ایفا می‌کند و به علت تغییر نسبت لنفوسیت‌های Th۱/Th۲ به سمت لنفوسیت‌های Th۲، باعث آمادگی مبتلا شدن به بیماری‌های وابسته به Th۲ مانند بیماری‌های آلرژیک و آسم می‌شود (۱۷).

بستن مسیر TIM-۳/Galectine-9 سبب افزایش شمار سلول‌های Th۱ در مدل موشی بیماری‌های خودایمنی می‌شود (۱۸). بررسی پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی نقش مهمی در شناخت عوامل ژنتیکی درگیر در بیماری آسم دارد. پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در نواحی مختلف ژن می‌تواند بر بیان یا عملکرد مولکول تأثیرگذار باشد. مقایسه‌ی توالی ناحیه‌ی رمزگذار TIM-۳ در دو گونه از موش نشان داد که پلی‌مورفیسم‌های ژن TIM-۳ با افزایش حساسیت به آسم ارتباط قوی دارد. اگرچه به طور کامل مشخص نیست کدام واریاسیون در ناحیه‌ی رمزگذار یا غیر

رمزگذار TIM-۳ منجر به افزایش بیان، پایداری یا عملکرد TIM-۳ می‌گردد (۱۹).

در مطالعه‌ی حاضر، پلی‌مورفیسم‌های ژنی ۴۲۵۹G>T دومین موسینی ژن TIM-۳ که باعث جایگزینی اسید آمینه‌ی آرژنین به جای لوسین می‌شود و ارتباط آن با بیماری آسم و سطح ایمونوگلوبولین E تام بررسی گردید.

نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نشان می دهد که توزیع ژنوتیپی GT در گروه بیمار اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد دارد. همچنین، مقدار OR برابر ۲/۱ حاکی از آمادگی مبتلا شدن به بیماری در افراد دارای آلل G به میزان ۲/۱ برابر بیشتر از افراد فاقد این آلل می باشد. آلل T در ایجاد این بیماری نقش حفاظتی ایفا می‌کند. همچنین با توجه به یافته های مربوط به سطح ایمونوگلوبولین E تام در گروه مورد و شاهد، هیچ ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ های افراد و سطح ایمونوگلوبولین E مشاهده نشد که می تواند ناشی از اثر عوامل محیطی و تأثیر کم ژن TIM-۳ در تولید این آنتی‌بادی و یا واکنش‌های متقابل ژن‌های مختلف باشد. برخی از مطالعات اخیر در جمعیت های آسیایی و سفید پوست (۲۰) نیز با نتایج مطالعه ی حاضر همخوانی داشت و نشان دهنده‌ی ارتباط پلی مورفیسم های ژن TIM-۳ با بیماری آسم است.

Chae و همکاران با بررسی چند پلی مورفیسم TIM-۳ در جمعیت کره گزارش کردند که فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی‌مورفیسم‌های ۵۷۴G>T- و ۴۲۵۹G>T+ در بیماران مبتلا به آسم و رینیت آلرژیک با افراد سالم متفاوت است و از این رو، ارتباط معنی‌داری میان این پلی‌مورفیسم‌ها و بیماری وجود دارد. آلل ۵۷۴T- تنها در بیماران مبتلا به آسم و رینیت یافت شد؛ در حالی که همه‌ی افراد شاهد سالم دارای آلل G بودند. همچنین آلل T در پلی‌مورفیسم ۴۲۵۹G>T با فراوانی بیشتری بین بیماران مبتلا به رینیت مشاهده شد و در بیماران مبتلا به آسم وجود نداشت (۲۱).

در مطالعه ی Zhang و همکاران در جمعیت کانادا هیچ ارتباط معنی‌داری میان پلی‌مورفیسم‌های ۸۸۲C>T-، ۵۷۴G>T- و ۱۵۱۶G>T- با بیماری آسم مشاهده نشد (۲۲). Graves و همکاران ارتباط احتمالی بین بیماری های آتوپیک در کودکان و سه پلی‌مورفیسم ۸۸۲C>T-، ۴۲۵۹T>G+ و ۲۲۷۱۳A>G را در جمعیت سفید پوست اسپانیایی بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که میان هیچ کدام از این سه پلی مورفیسم با بیماری آسم در کودکان ارتباطی وجود ندارد (۲۰) و این تفاوت‌ها می‌تواند به دلایل گوناگون از جمله تفاوت های نژادی، حجم نمونه و معیارهای ورود و خروج از مطالعه باشد.

با توجه به این که تحقیق حاضر اولین مطالعه در خصوص ارتباط پلی مورفیسم ژن TIM-۳ و بیماری آسم در ایران بود، انجام مطالعات مشابه در سایر جمعیت‌های ایران و در حجم نمونه‌ی بیشتر و همچنین بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم یاد شده در بیان ژن TIM-۳ ضروری به نظر می‌رسد. پلی‌مورفیسم ژن TIM-۳ می‌تواند به عنوان مارکر ژنتیکی برای تشخیص افراد دارای زمینه ی آسم در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران و تمام استادان گرانقدر گروه

ژنتیک و ایمنی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که صمیمانه در اجرای این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد. پژوهش حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد می‌باشد و هزینه‌های اجرای آن توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین گردید.

References

1. Locksley RM. Asthma and allergic inflammation. Cell 2010; 140(6): 777-83.
2. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. Nat Immunol 2015; (16): 1-45.
3. Basely R. Global burden of asthma | GINA - Global Initiative for Asthma [Online]. [cited 2014 Sep 9]; Available from: URL: www.ginasthma.org/Global-Burden-of-Asthma.
4. Braman SS. The global burden of asthm. Chest 2006; 130(1_suppl): 4S-12S.
5. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. Clin Exp Allergy 2008; 38(6): 872-97.
6. Nakajima H, Hirose K. Role of IL-23 and Th17 Cells in Airway Inflammation in Asthma. Immune Netw 2010; 10(1): 1-4.
7. Sonar SS, Hsu YM, Conrad ML, Majeau GR, Kilic A, Garber E, et al. Antagonism of TIM-1 blocks the development of disease in a humanized mouse model of allergic asthma. J Clin Invest 2010; 120(8): 2767-81.
8. Ueno T, Habicht A, Clarkson MR, Albin MJ, Yamaura K, Boenisch O, et al. The emerging role of T cell Ig mucin 1 in alloimmune responses in an experimental mouse transplant model. J Clin Invest 2008; 118(2): 742-51.
9. Li Z, Ju Z, Frieri M. The T-cell immunoglobulin and mucin domain (Tim) gene family in asthma, allergy, and autoimmunity. Allergy Asthma Proc 2013; 34(1): e21-e26.
10. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. Immunol Rev 2010; 235(1): 172-89.
11. Kuchroo VK, Meyers JH, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM Family of Genes in Immunity and Tolerance. In: Frederick WA, editor. Advances in Immunology. Volume 91 ed. Academic Press; 2006. p. 227-49.
12. de Souza AJ, Kane LP. Immune regulation by the TIM gene family. Immunol Res 2006; 36(1-3): 147-55.
13. Li X, Zhao YQ, Li CW, Yuan FL. T cell immunoglobulin-3 as a new therapeutic target for rheumatoid arthritis. Expert Opin Ther Targets 2012; 16(12): 1145-9.
14. Vega-Carrascal I, Reeves EP, McElvaney NG. The role of TIM-containing molecules in airway disease and their potential as therapeutic targets. J Inflamm Res 2012; 5: 77-87.
15. Seki M, Oomizu S, Sakata KM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. Clin Immunol 2008; 127(1): 78-88.
16. Curtiss ML, Gorman JV, Businga TR, Traver G, Singh M, Meyerholz DK, et al. Tim-1 regulates Th2 responses in an airway hypersensitivity model. Eur J Immunol 2012; 42(3): 651-61.
17. Lee J, Phong B, Egloff AM, Kane LP. TIM polymorphisms--genetics and function. Genes Immun 2011; 12(8): 595-604.
18. Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. Trends Immunol 2011; 32(8): 345-9.
19. Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity. Curr Opin Immunol 2006; 18(6): 665-9.
20. Graves PE, Siroux V, Guerra S, Klimecki WT, Martinez FD. Association of atopy and eczema with polymorphisms in T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-IL-2-inducible T-cell kinase gene cluster in chromosome 5 q 33. J Allergy Clin Immunol 2005; 116(3): 650-6.
21. Chae SC, Park YR, Lee YC, Lee JH, Chung HT. The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population. Hum Immunol 2004; 65(12): 1427-31.
22. Zhang J, Daley D, Akhabir L, Stefanowicz D, Chan-Yeung M, Becker AB, et al. Lack of association of TIM3 polymorphisms and allergic phenotypes. BMC Med Genet 2009; 10: 62.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 08.11.2014
Vol. 32, No. 314, 3rd Week, February 2015
Accepted: 03.01.2015

Prevalence of TIM-3 Gene Polymorphisms in Patients with Asthma and its correlation with Serum Levels of Immunoglobulin-E of These Patients in Isfahan, Iran

Maryam Sadri MSc[1], Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD[2], Rasoul Salehi PhD[3], Ramin Ghasemi MD[4], Sedigheh Rastaghi MSc[5]

Original Article

Abstract

Background: Asthma is a chronic inflammatory disease of airways and is a multifactorial disease in which, several genes have been identified affecting occurrence and severity of the disease. T-cell immunoglobulin mucin (TIM) gene family that is expressed on T cells and its locus is located on chromosome 5 is one of these genes. A member of the TIM family, TIM-3, is selectively expressed on the surface of differentiated T helper-1 (Th1) cells. Interactions between TIM3 and galectin-9 (TIM3 ligand) regulate Th1 responses and play an important role in the development of allergic disease. Polymorphisms, that affect the structure and function of molecules, may increase the susceptibility to allergic diseases and asthma. In the present study, we assessed the association of the genotype and allele frequencies of the 4259G>T polymorphisms with asthma and the relationships among this polymorphism to IgE levels in patients with asthma.

Methods: In this case-control study, we had 209 patients with asthma in case group and 200 healthy people in control group. The variant of genotypes was determined using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. The association of this polymorphism and serum immunoglobulin E was analyzed via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. To assess the frequency of genotypes and its relationship with serum immunoglobulin E and asthma, chi-square test was used and $P < 0.05$ was considered significant.

Findings: The genotype and allele frequency of 4259G>T polymorphism were significantly different between the patient and controls**.** Significant association was observed between this polymorphism and the risk of asthma.

Conclusion: The results showed that the 4259G>T polymorphism of TIM3 gene may be associated with the susceptibility of asthma and this polymorphism may affect the performance of TIM3 binding to the ligand molecule (Galectine 9).

Keywords: Asthma, Polymorphism, T-cell immunoglobulin mucin-3 (TIM3)

Citation: Sadri M, Ganjalikhani-Hakemi M, Salehi R, Ghasemi R, Rastaghi S. **Prevalence of TIM-3 Gene Polymorphisms in Patients with Asthma and its correlation with Serum Levels of Immunoglobulin-E of These Patients in Isfahan, Iran.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(314): 2193-2201

1- Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Cellular and Molecular Immunology Research Center AND 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- Sub-Specialist of Asthma, Allergy and Clinical Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Department of Biostatistics, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD, Email: mghakemi@med.mui.ac.ir