مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۴۱/هفته اول شهریور ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۳۱

مقایسه‌ی فراوانی پلی‌مورفیسم ژن TIM-۳ در بیماران دچار مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم

معصومه پولادیان[۱]، دکتر مزدک گنجعلی‌خانی حاکمی[۲]، دکتر رسول صالحی[۳]، دکتر فرشته آل صاحب فصول[۴]، شریفه خسروی[۵]، دکتر مسعود اعتمادی‌فر[۶]، فریبا مزروعی[۱]

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه: مولتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis یا MS) یک بیماری خودایمن مزمن در سیستم عصبی مرکزی (CNS یا Central nervous system) است که با پاسخ سلول‌های لنفوسیت T به آنتی‌ژن‌های میلین ایجاد می‌شود. یکی از انواع گیرنده‌های سطح سلولی لنفوسیت‌های T مولکول‌های خانواده‌ی TIM (T-cell immunoglobulin and mucin domain) هستند که SNPهای (Single nucleotide polymorphisms) متعددی در ژن مربوط به آن‌ها شناسایی شده است. این SNPها همواره با بیماری‌های خودایمن مختلفی در ارتباط بوده‌اند. هدف از این مطالعه، مقایسه‌ی فراوانی پلی‌مورفیسم 4259A>C+ ژن TIM-۳ در بیماران دچار مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم در اصفهان بود تا مشخص شود که آیا این پلی‌مورفیسم زمینه‌ساز بیماری فوق در اصفهان می‌باشد؟

روش‌ها: DNA سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA، از خون افراد جدا شد. در این مطالعه، از روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) استفاده کردیم. ابتدا ژن TIM-۳ تکثیر شد؛ سپس، در مجاورت آنزیم خرد کننده قرار گرفت. با تکنیک الکتروفورز، قطعات حاصل از هضم آنزیمی تفکیک شد و مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌ها و الل‌های پلی‌مورفیسم 4259A>C+ در بیماران و افراد سالم مشاهده شد (P = ۰/۰۲۹). شانس ابتلا به بیماری در افرادی که حامل الل C بودند، حدود ۲ برابر افراد فاقد این الل بود (P = ۰/۰۱۰).

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم 4259A>C+ ممکن است در ابتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس نقش داشته باشد. برای درک بیشتر می‌توان، اثر این پلی‌مورفیسم را بر بیان و نحوه‌ی عمل مولکول TIM-۳ بررسی کرد.

واژگان کلیدی: پلی‌مورفیسم، TIM-۳ (T-cell immunoglobulin and mucin domain-۳)، مولتیپل اسکلروزیس

ارجاع: پولادیان معصومه، گنجعلی‌خانی حاکمی مزدک، صالحی رسول، آل صاحب فصول فرشته، خسروی شریفه، اعتمادی‌فر مسعود، مزروعی فریبا. **مقایسه‌ی فراوانی پلی‌مورفیسم ژن TIM-۳ در بیماران دچار مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۱): ۱۰۷۵-۱۰۶۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- استاد، گروه داخلی اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مزدک گنجعلی‌خانی حاکمی
Email: mghakemi@med.mui.ac.ir

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis یا MS) یک بیماری خود ایمن مزمن در سیستم عصبی مرکزی (Central nervous system یا CNS) است که مشخصه‌ی آن دمیلینه شدن و تخریب شدید آکسون می‌باشد. MS، یک بیماری کمپلکس است که توسط پاسخ‌های سلول T به آنتی‌ژن‌های میلین ایجاد می‌شود و وقوع آن در بین افراد جوان ۴۰-۲۰ سال اتفاق می‌افتد. هر ساله، نزدیک به یک میلیون نفر در جهان به MS مبتلا می‌شوند. توصیف اتیولوژی بیماری MS مشکل است. اما باور بر این است که این بیماری، از هر دو عامل ژنتیک و محیط تأثیر می‌پذیرد (۱). لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها، در تنظیم پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولار نقش مهمی ایفا می‌کنند (۲). گمان بر این است که بیماری MS توسط سلول‌های T کمکی ۱ (Th۱ یا T helper۱) خود واکنشگر علیه آنتی‌ژن‌های میلین راه‌اندازی و تنظیم می‌شود (۳).

خانواده‌ی TIM (T cell immunoglobulin and mucin domain) شامل سه عضو TIM-۱، TIM-۲ و TIM-۳ در انسان است که روی کروموزوم ۵ قرار دارند. این ناحیه‌ی ژنی، همواره با انواع بیماری‌های آسم، آلرژی و بیماری‌های خود ایمن در ارتباط بوده است (۴). این گیرنده‌های سطح سلولی، با تنظیم سلول‌های Th۱ و Th۲ کارگزار، عملکردهای ایمونولوژیکی مهمی دارند (۵).

TIM-۳ ابتدا روی سلول‌های Th۱ تمایز یافته شناسایی شد، اما امروزه می‌دانیم که این گلیکوپروتئین، بر روی سلول‌های ایمنی ذاتی مثل سلول‌های دندریتیک (Dendritic cell یا DC)، ماکروفاژ و ماست‌سل‌ها نیز وجود دارد. TIM-۳ همین طور بر روی سلول‌های T CD۸+ و Th۱۷ نیز بیان می‌شود. گالکتین-۹ (Gal-۹ یا Galectin-۹) لیگاند TIM-۳ است که با اتصال به TIM-۳ یک مسیر کمک تحریکی مهاری در سلول T راه‌اندازی می‌کند و در نهایت، موجب مرگ سلول Th۱ می‌شود (۷-۶). به نظر می‌رسد Th۱ و سایتوکاین مهم آن یعنی IFN-γ (Interferon gamma) با بعضی از بیماری‌های خود ایمن اختصاصی بافت، مانند MS، ارتباط دارند. IFN-γ، موجب افزایش بیان گالکتین-۹ در سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (APC یا Antigen presenting cell) و در نتیجه، القای مرگ سلولی (Apoptosis) در سلول‌های Th۱ دارای TIM-۳ می‌شود.

مطالعات اخیر، نشان داده‌اند که اختلال در این مسیر مولکولی، ممکن است زمینه را برای راه‌اندازی بیماری‌های التهابی مثل MS ایجاد کند. کاهش بیان TIM-۳ و یا عملکرد ناکارامد آن، ممکن است موجب اختلال در مرگ به واسطه‌ی گالکتین-۹ در سلول Th۱ در بیماری MS شود. در نتیجه، در چنین شرایطی، IFN-γ افزایش می‌یابد و التهاب را تشدید می‌کند (۸).

تحقیقات بر روی خانواده‌ی TIM نشان داده است که این مولکول‌ها، در حفظ تعادل Th۱/Th۲ درگیر هستند. بنابراین، می‌توانند به عنوان یک هدف دارویی به منظور بردن تعادل به سمت شرایط فیزیولوژیکی بهتر استفاده شوند (۹).

مطالعات اولیه، حاکی از وجود تعداد زیادی SNP (Single nucleotide polymorphisms) در ناحیه‌ی ژنی خانواده‌ی TIM بوده است (۱۰). بعضی از این

پلی‌مورفیسم‌ها که بر روی عملکرد TIM-۳ اثر می‌گذارند، ممکن است پاسخ‌های Th۱ را تحت تأثیر قرار دهند (۱۱) که موجب راه‌اندازی شرایطی برای ایجاد بیماری‌های خود ایمن مانند MS می‌شود (۸).

پژوهش‌هایی در کره و چین نشان دادند که پلی‌مورفیسم A>C 4259+ در TIM-۳، ممکن است با استعداد به ابتلا به بیماری روماتوئید آرتریت (RA یا Rheumatoid arthritis) ارتباط داشته باشد (۱۴-۱۲). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که پلی‌مورفیسم A>C 4259+ در TIM-۳، که در ناحیه‌ی موسینی پروتئین TIM-۳ قرار دارد، ممکن است یکی از عوامل ژنتیکی مهم در ارتباط با RA در بین جمعیت‌های مختلف آسیایی باشد؛ همچنین، واریانت‌های (الل‌های گوناگون) ژنتیکی TIM در آمادگی ابتلا به دیگر بیماری‌های خود ایمن با ایمونوپاتوژنسیتی مشابه RA شرکت می‌کنند.

با توجه به این که تنها یک دهه از شناسایی خانواده‌ی TIM می‌گذرد، این مولکول‌ها می‌توانند در آینده به عنوان اهداف دارویی جدید برای انواع نقص‌های ایمنی به شمار آیند. بنابراین، مطالعه‌ی جنبه‌های مختلف خانواده‌ی TIM در زمینه‌ی این بیماری‌ها ضروری است. تعیین ارتباط بین TIM-۳ و MS در جمعیت‌های مختلف، می‌تواند برای درک بهتر اساس ژنتیکی، تشخیص و پیش‌آگهی بیماری MS مفید باشد.

طبق گزارش اعتمادی‌فر و ابطحی، شهر اصفهان یک منطقه با خطر رو به افزایش شیوع بیماری MS در منطقه‌ی آسیا و اقیانوسیه است (۱۵). با توجه به شباهت نسبی مکانیسم ایمونوپاتوژنز بیماری MS و RA و نقش Th۱ در هر دو بیماری، پژوهش حاضر با هدف بررسی پلی‌مورفیسم A>C 4259+ در TIM-۳، در بیماران مبتلا به MS در جمعیت اصفهان انجام شد.

روش‌ها

مطالعه بر روی ۱۴۰ بیمار غیر خویشاوند مبتلا به بیماری RRMS (Relapsing Remitting MS) به عنوان گروه مورد و ۱۳۸ نفر از افراد سالم غیر حامله و بدون سابقه‌ی بیماری‌های خود ایمنی، التهابی (باکتریایی، ویروسی و انگلی) و بدون سابقه‌ی پیوند اعضا که از نظر سن و نژاد با بیماران سازگار بودند و برای اهدای خون به سازمان انتقال خون مراجعه نموده بودند، به عنوان گروه شاهد انجام شد. مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأیید شد و از تمام افراد شرکت کننده در مطالعه رضایت‌نامه‌ی کتبی دریافت گردید.

استخراج DNA: ۲ میلی‌لیتر از خون کامل افراد در لوله‌ی حاوی ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) جمع‌آوری شد. طبق دستورالعمل کیت استخراج DNA شرکت کیاژن، DNA از نمونه‌ی خون تهیه شده از بیماران و افراد سالم استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و اندازه‌گیری OD (Optical density) آن در ۲۶۰ nm بررسی شد.

بررسی پلی‌مورفیسم A>C (rs۱۰۳۶۱۹۹) 4259+: برای انجام این تحقیق، از روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism) استفاده گردید. ناحیه‌ی پلی‌مورفیک ژن TIM-۳ با

استفاده از تکنیک PCR تکثیر شد. PCR برای هر نمونه در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۰/۹ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۶ میکرولیتر dNTPs mix (Deoxynucleotide triphosphates)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای Forward و Reverse (R: ۵´-GGCAGGTTTGGAAGCTGA-۳´ و F: ۵´-GGGAAGGTGATGGGCTTT-۳´) و ۰/۳ میکرولیتر (۱/۵ U) آنزیم Taq DNA polymerase (CinnaGen Co, Iran) به همراه ۲ میکرولیتر (۱۰۰ ng) DNA ژنومی افراد بود.

برنامه‌ی داده شده به دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD,T۱۰۰T^M, USA) در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. برنامه‌ی استفاده شده برای تکثیر ژن در ترموسایکلر

مراحل آزمایش	دما (°C)	زمان (s)
First denaturation	۹۴	۳۰۰
Denaturation	۹۴	۳۰
Annealing	۵۵	۴۵
Extension	۷۲	۳۰
Final extension	۷۲	۳۰۰

به منظور اطمینان از صحت انجام PCR، ۵ میکرولیتر از تمامی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. نمایان شدن باندهای ۶۴۹ bp در زیر نور UV نشان از درستی انجام کار بود. برای دیدن باندها از رنگ فلورسنت Green viewer (Afratoos, Iran) استفاده گردید.

سپس محصولات PCR برای انجام RFLP استفاده شدند. باندهای ۶۴۹ bp توسط آنزیم خرد کننده‌ی PstI (Thermo scientific Co. Lithuania) به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ ^oC هضم شدند. قطعات به دست آمده از محصولات هضم شده روی ژل آگارز ۳ درصد و در حضور نشانگر ۵۰ bp (CinnaGen Co, Iran) در جدول ۲ آمده است.

تصویر قطعات هضم شده در حضور آنزیم در مقایسه با محصول PCR در شکل ۱ دیده می‌شود. در بعضی موارد، برای تفکیک بهتر و شناسایی دقیق‌تر ژنوتیپ‌های AC، از تکنیک PAGE (Poly acryl amide gel electrophoresis) استفاده شد. قطعات ۱۵۹ bp و ۱۷۵ bp بر روی ژل ۸ درصد پلی‌اکریل‌آمید با وضوح بسیار بیشتری از هم تفکیک می‌شدند. جهت ساخت ژل پلی‌اکریل‌آمید، ۶ میلی‌لیتر اکریل- بیس‌اکریل‌آمید ۳۰ درصد (CMG Co, Iran)، ۵ میلی‌لیتر TBE (Tris/Borate/EDTA) ۵ درصد، ۱۴ میلی‌لیتر dH_2O (Distilled H_2O)، ۲۰۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۵ درصد و ۲۰ میکرولیتر TEMED (Tetra methyl ethylene ediamine) (Merck, Germany) استفاده شد. ولتاژ ۷۰ به مدت حدود ۶ ساعت برای الکتروفورز اعمال شد.

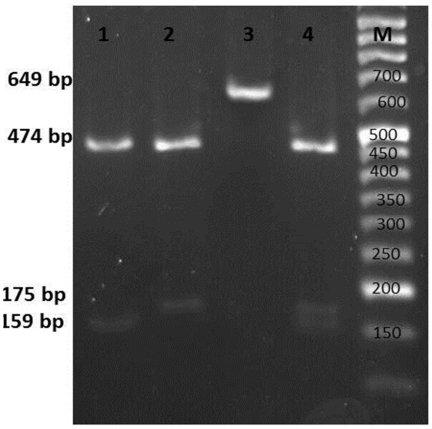
جدول ۲. قطعات به دست آمده بر اثر هضم آنزیمی

ژنوتیپ	PCR fragment	فنوتیپ
CA	۱۶، ۱۵۹، ۱۷۵، ۴۷۴ bp	Mutant heterozygote
CC	۱۷۵، ۴۷۴ bp	Mutant homozygote
AA	۱۶، ۱۵۹، ۴۷۴ bp	Wild type

توالی‌یابی مستقیم چندین نمونه‌ی مثبت و منفی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد و با استفاده از نرم‌افزار Bioneer تأیید شد.

در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، برای تعیین فراوانی ژنوتیپ و الل در گروه مورد و شاهد، از نرم‌افزار آنالیز آماری SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد.

برای مقایسه‌ی توزیع ژنوتیپ و فراوانی الل بین بیماران MS و افراد شاهد، آزمون χ^2 استفاده شد. ارتباط همبستگی پلی‌مورفیسم A>C +4259 و بیماری MS با اندازه‌گیری تخمین شانس خطر ابتلا (OR یا Odds ratios) با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد توضیح داده شد. به دلیل این که در طول دوره‌ی نمونه‌گیری، بیشتر داوطلب‌های مراجعه کننده به سازمان انتقال خون مرد بودند (۶۸/۱ درصد مرد و ۳۱/۹ درصد زن) برای کنترل اثر مخدوشگر ناهمگنی توزیع جنس در دو گروه، از یک آزمون پیشرفته‌ی آماری دیگر به نام Mantel-Haenszel نیز استفاده گردید.



شکل ۱. الکتروفورز قطعات به دست آمده از اثر آنزیم خرد کننده‌ی PstI. M: نشانگر، ۱: ژنوتیپ AA، ۲: ژنوتیپ CC، ۳: محصول PCR، ۴: ژنوتیپ AC

یافته‌ها

در این مطالعه، SNP A>C +4259 بر روی ژن TIM-۳ در بین ۱۴۰ بیمار (۱۱۶ زن و ۲۴ مرد) مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و ۱۳۸ فرد سالم (۴۴ زن و ۹۴ مرد) از جمعیت اصفهان بررسی شد. تعدادی از خصوصیات گردآوری شده‌ی افراد دو گروه، در جدول ۳ آمده است. آزمون مستقل t، تفاوت قابل توجهی بین میانگین سن افراد در دو گروه نشان نداد (P = ۰/۵۸۰).

آزمون χ^2 نشان داد که توزیع فراوانی پلی‌مورفیسم A>C +4259 در دو گروه، به میزان قابل توجهی معنی‌دار بود (P = ۰/۰۲۹). این نتایج نشان می‌دهد که این پلی‌مورفیسم در ژن TIM-۳، ممکن است با استعداد به ابتلا به MS در ارتباط باشد. فراوانی الل A و C نیز با استفاده از این آزمون اندازه‌گیری شد که به میزان قابل توجهی در بین دو گروه متفاوت بود (P = ۰/۰۱۰).

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، فراوانی الل C در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد است. همین‌طور، شانس ابتلا به بیماری در افراد حامل الل C در مقایسه با افرادی که این الل را نداشتند، حدود ۲ برابر بیشتر است (OR = ۱/۹۴).

از آن جایی که فراوانی توزیع جنس در دو گروه همگن نبود، فراوانی الل C در گروه مورد به تفکیک جنس نیز بررسی شد؛ این الل در گروه مورد به میزان زیادی بیشتر از افراد شاهد بود (در زنان P = ۰/۰۲۴، در مردان P = ۰/۰۱۷) (جدول ۵).

آزمون Mantel-Haenszel نیز نشان داد که اگر توزیع جنس در دو گروه یکسان بود، فراوانی الل SNP A>C +4259 در بین دو گروه معنی‌دار بود (P = ۰/۰۱۰).

جدول ۳. تعدادی از مشخصه‌های افراد در دو گروه مورد و شاهد

متغیرها		مورد	شاهد	مقدار P
سن میانگین ± انحراف معیار		۳۱/۹ ± ۸/۵	۳۱/۴ ± ۶/۴	۰/۵۸۰
جنس	مرد	۲۴ (۱۷/۱)	۹۴ (۶۸/۱)	< ۰/۰۰۱
	زن	۱۱۶ (۸۲/۹)	۴۴ (۳۱/۹)	
جمع کل		۱۴۰ (۱۰۰)	۱۳۸ (۱۰۰)	
EDSS	۱	۹۲ (۶۵/۷)		
	۱/۵	۲۴ (۱۷/۱)		
	۲	۱۵ (۱/۷)		
	۳–۵	۹ (۶/۴)		
جمع کل		۱۴۰ (۱۰۰)		
علایم در شروع بیماری	بی‌حسی دست و پا	۷۱ (۵۰/۷)		
	تاری دید یا دوبینی	۵۵ (۳۹/۲)		
	سرگیجه	۱۴ (۱۰/۰)		
جمع کل		۱۴۰ (۱۰۰)		

EDSS: Expanded disability status score

جدول ۴. آنالیز ژنوتیپ و الل پلی‌مورفیسم +4259 A>C در گروه‌های مورد و شاهد

ژنوتیپ/ الل	مورد تعداد (درصد)	شاهد تعداد (درصد)	Odds ratio (CI: ٪۹۵)	مقدار P
TIM-3 +4259A>C			۱/۸۴۱ (۱/۰۰۵–۳/۳۷۴)	
AA	۱۰۲ (۷۲/۹)	۱۱۶ (۸۴)	۴/۳۶۰ (۱/۵۰۰–۴/۵۴۹)	۰/۰۲۹
AC	۳۴ (۲۴/۳)	۲۱ (۱۵/۲)	۱/۹۴۰ (۱/۱۳۰–۳/۳۳۰)	۰/۰۱۰
CC	۴ (۲/۸)	۱ (۰/۷)		
کل	۱۴۰ (۱۰۰)	۱۳۸ (۱۰۰)		
A	۲۳۸ (۸۵/۰)	۲۵۳ (۹۱/۷)		
C	۴۲ (۱۵/۰)	۲۳ (۸/۳)		
کل	۲۸۰ (۱۰۰)	۲۷۶ (۱۰۰)		

جدول ۵. توزیع فراوانی الل بین دو گروه شاهد و مورد به تفکیک جنس

جنس	الل	شاهد تعداد (درصد)	مورد تعداد (درصد)	Odds ratio (CI: ٪۹۵)	مقدار P
زن	C	۴ (۴/۵)	۳۱ (۱۳/۴)		
	A	۸۴ (۹۵/۵)	۲۰۱ (۸۶/۶)	۳/۲۴۰ (۱/۱۱۰–۹/۴۶۱)	۰/۰۲۴
	کل	۱۰۰ (۸۸/۰)	۲۳۲ (۱۰۰)		
مرد	C	۱۹ (۱۰/۱)	۱۱ (۲۲/۹)		
	A	۱۶۹ (۸۹/۹)	۳۷ (۷۷/۱)	۲/۶۴۰ (۱/۱۶۱–۶/۰۲۴)	۰/۰۱۷
	کل	۱۸۸ (۱۰۰)	۴۸ (۱۰۰)		

بحث

از آن جایی که TIM-۳ در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش دارد، در صورت وجود جهش در ژن آن، ممکن است شکل و عملکرد ملکول تحت تأثیر قرار بگیرد و به ایجاد بیماری‌های خود ایمن کمک کند (۱۷-۱۶). مولکول‌های TIM-۳ عملکرد سلول‌های میلوییید را نیز تنظیم می‌کنند. علاوه بر سلول‌های Th۱ سلول‌های مختلف دیگری نظیر Th۱۷، میکروگلیا، ماکروفاژها، سلول‌های دندرتیک و کشنده‌های طبیعی (NK یا Natural killer) نیز میزان کمی TIM-۳ بیان می‌کنند. هر نوع تغییر ژنتیکی، در نهایت ممکن است به گونه‌ای بر فعالیت این سلول‌ها اثر بگذارد. بنابراین، سلول‌ها در مراحل مختلف بیماری تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱۸، ۱۱).

بر اساس جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی، به نظر می‌رسد مطالعه‌ی حاضر نخستین تحقیق در ارتباط با همبستگی این پلی‌مورفیسم با خطر ابتلا به MS در یک جمعیت است. حضور SNP +4259 A>C در ژن TIM-۳ موجب یک جابه‌جایی اسید آمینه‌ای Leu ۱۴۰ Arg (تبدیل آدنین (A) به سیتوزین (C) در ژن TIM-۳، موجب جابه‌جایی اسید آمینه‌ی لوسین در حالت طبیعی، با اسید آمینه ی آرژنین، در موقعیت ۱۴۰ پروتئین TIM-۳ می‌شود) در ساختار ناحیه‌ی موسینی پروتئین TIM شود و ممکن است بر افینیتی ناحیه‌ی اتصال به لیگاند (Gal-۹) و یا میزان فعالیت آن تأثیر بگذارد.

در حقیقت، IFN-γ تولید شده توسط Th۱، تولید Gal-۹ را افزایش می‌دهد که اتصال آن به TIM-۳ نیز موجب مرگ سلول Th۱ می‌شود، اما کاهش بیان و یا نقص در TIM-۳، موجب اختلال در این حلقه‌ی فیدبک منفی در بیماران MS می‌شود. در نتیجه، سلول‌های T خود واکنشگر تولید کننده‌ی میزان زیادی IFN-γ در این بیماران دیده می‌شوند (۱۹، ۱۲، ۸).

مولکول‌های TIM-۳ معیوب در سلول‌های T تنظیمی $CD۴^{+}$ $CD۲۵^{+}$، مسیرهای تنظیمی وابسته به TIM-۳ در این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین، این سلول‌های تنظیمی، نمی‌توانند سلول‌های T خود واکنشگر در نتیجه‌ی تولید INF-γ در این بیماران را سرکوب کنند (۲۰).

در این پژوهش، مشاهده شد که پلی‌مورفیسم +4259 A>C در TIM-۳ ممکن است با زمینه‌ی دچار شدن به بیماری MS در ارتباط باشد ($P < ۰/۰۵۰$). علاوه بر این، در افراد حامل الل C، خطر ابتلا به بیماری بالا است. در طی سال‌های گذشته، ارتباط این پلی‌مورفیسم با دیگر بیماری‌های خود ایمن، مطالعه شده است. پژوهش‌هایی در چین نشان دادند که +4259 A>C ممکن است با ابتلا به RA در ارتباط باشد (۱۴، ۱۲). همچنین، 4259 A>C و پنج SNP دیگر در کره بررسی شدند. مشاهده شد که پلی‌مورفیسم مورد نظر در بیماران RA بسیار بیشتر بود (۱۳).

از آن جایی که مولکول TIM-۳ روی سلول‌های Th۱، Th۱۷، ماکروفاژ و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شوند و این سلول‌ها در پاتوژنیسیتی بیماری MS نقش دارند، پس در صورت حضور جهش در این سلول‌ها، احتمال تأثیر آن روی بیماری MS دور از انتظار نیست (۲۱، ۸).

به طور معمول، سلول‌های Th۱ و سیتوکاین‌های آن‌ها، با پاسخ‌های ایمنی سلولی و بیماری‌های خود ایمن اختصاصی بافت مانند دیابت نوع ۱، RA و MS

ارتباط دارند (۹). این سلول‌ها از نظر مکانیسم‌های ایمونوپاتوژنز و نقش این سلول‌ها به نسبت مشابه هستند. ارتباط A>C 4259 در TIM–۳ و ایجاد بیماری RA در جمعیت‌های مختلف بررسی شده است و یافته‌ها حاکی از فراوانی معنی‌دار این پلی‌مورفیسم در بیماران، در مقایسه با افراد سالم بوده است.

همان‌طور که در جدول ۴ دیده می‌شود، مطالعه‌ی حاضر نیز یافته‌هایی مشابه در مورد بیماری MS به دست آورد. فراوانی الل و ژنوتیپ در بین بیماران معنی‌دار بود (به ترتیب P = ۰/۰۱۰ و P = ۰/۰۲۹). تغییرات ژنتیکی در این مولکول‌های سطح سلولی، ممکن است موجب آمادگی ابتلا به بیماری‌هایی مثل RA و MS شود (۸).

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان دادند که پلی‌مورفیسم A>C 4259+ واقع در اگزون ژن TIM–۳ با بیماری مولتیپل اسکلروزیس در جمعیت اصفهان ارتباط دارد. به منظور درک بهتر نقش TIM–۳ و نیز پلی‌مورفیسم‌های آن در MS، اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های حامل چنین پلی‌مورفیسم‌هایی و بررسی عملکرد و ساختار پروتئین‌های مرتبط می‌تواند مفید باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد معصومه پولادیان به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۲۲۶۷ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. بدین وسیله از تمامی افرادی که پژوهشگران را در اجرای این تحقیق یاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Bahreini SA, Jabalameli MR, Saadatnia M, Zahednasab H. The role of non-HLA single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis susceptibility. J Neuroimmunol 2010; 229(1-2): 5-15.
2. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990; 346(6283): 425-34.
3. Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK, Hafler DA. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. J Exp Med 2006; 203(6): 1413-8.
4. Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, Umetsu DT. The costimulatory role of TIM molecules. Immunol Rev 2009; 229(1): 259-70.
5. Zhao W, Li Y, Wang Z, Li K, Yang S. Molecular characterization of the porcine TIM-3 gene. Scand J Immunol 2011; 73(1): 29-35.
6. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. Nat Immunol 2005; 6(12): 1245-52.
7. Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, Koguchi K, Greenfield EA, Kent SC, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. Eur J Immunol 2009; 39(9): 2492-501.
8. Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity. Curr Opin Immunol 2006; 18(6): 665-9.
9. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. Trends Mol Med 2005; 11(8): 362-9.
10. Lee J, Phong B, Egloff AM, Kane LP. TIM polymorphisms--genetics and function. Genes Immun 2011; 12(8): 595-604.
11. 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.
12. Chae SC, Park YR, Shim SC, Yoon KS, Chung HT. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. Immunol Lett 2004; 95(1): 91-5.
13. Song YW, Im CH, Park JH, Lee YJ, Lee EY, Lee EB, et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 genetic polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis independent of a shared epitope status. Hum Immunol 2011; 72(8): 652-5.

14. Xu J, Yang Y, Liu X, Wang Y. The -1541 C>T and +4259 G>T of TIM-3 polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Chinese Hui population. Int J Immunogenet 2011; 38(6): 513-8.
15. Etemadifar M, Abtahi SH. Multiple sclerosis in Isfahan, Iran: Past, Present and Future. Int J Prev Med 2012; 3(5): 301-2.
16. Khademi M, Illes Z, Gielen AW, Marta M, Takazawa N, Baecher-Allan C, et al. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. J Immunol 2004; 172(11): 7169-76.
17. Nuchnoi P, Ohashi J, Kimura R, Hananantachai H, Naka I, Krudsood S, et al. Significant association between TIM1 promoter polymorphisms and protection against cerebral malaria in Thailand. Ann Hum Genet 2008; 72(Pt 3): 327-36.
18. Kane LP. T cell Ig and mucin domain proteins and immunity. J Immunol 2010; 184(6): 2743-9.
19. Su EW, Lin JY, Kane LP. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. Cytokine 2008; 44(1): 9-13.
20. Yang L, Anderson DE, Kuchroo J, Hafler DA. Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis. J Immunol 2008; 180(7): 4409-14.
21. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. Nature 2002; 415(6871): 536-41.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 26.04.2014
Vol. 33, No. 341, 1st Week, September 2015
Accepted: 22.07.2014

Comparing the Frequency of TIM-3 Polymorphism in Multiple Sclerosis Patients with Healthy Controls

Masoumeh Pouladian[1], Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD[2], Rasoul Salehi PhD[3], Fereshteh Ale-Sahebfosul PhD[4], Sharifeh Khosravi MSc[5], Masoud Etemadifar MD[6], Fariba Mazrouei[1]

Short Communication

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS) initiated and mediated by autoreactive T-helper1 cells directed against myelin antigens. One of the T-cell surface receptors is T-cell immunoglobulin and mucin domain (TIM) family. There are several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in their sequences witch had associated with susceptibility to different autoimmune diseases. The aim of this study was to investigate the susceptibility of patients with multiple sclerosis in Isfahan population, Iran, with polymorphism +4259A>C in TIM-3 gene.

Methods: Blood samples were collected. DNA was extracted from the blood samples using Genomic DNA Extraction Kit. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed. TIM-3 gene was amplified using PCR. Then, the products were digested with restriction enzyme, PstI. Electrophoresis was performed for separating the digested products.

Findings: Genotype and allele carrier frequency between patient and healthy groups were statistically significant (P = 0.029). The odds ratio of susceptibility to multiple sclerosis for whom carrying C allele of TIM-3, compared with those who do not carry, was about 2 (P = 0.010).

Conclusion: +4259A>C polymorphism in TIM-3 gene is associated with multiple sclerosis in Isfahan population, measuring the expression level of the genes carrying such polymorphisms and their relevant protein functional and/or structural analysis could be helpful.

Keywords: T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM-3), Multiple sclerosis, Polymorphism

Citation: Pouladian M, Ganjalikhani-Hakemi M, Salehi R, Ale-Sahebfosul F, Khosravi Sh, Etemadifar M, et al. **Comparing the Frequency of TIM-3 Polymorphism in Multiple Sclerosis Patients with Healthy Controls.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(341): 1066-75

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Cellular and Molecular Immunology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- PhD Student, Department of Genetics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6- Professor, Department of Neurology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD, Email: mghakemi@med.mui.ac.ir