دوفصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال یازدهم، شماره ۲، صفحه ۱۳۸ - ۱۲۹ (اسفند ۱۳۸۷)

پلی مرفیسم‌های ژن اینترلوکین ۱۰ و استعداد ابتلا به تب مالت در بیماران ایرانی

دکتر منوچهر رسولی*[۱]، سیمین کیانی[۲]، مریم به بین[۲]

[۱] مربی گروه ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۲] کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

چکیده

زمینه: گونه‌های بروسلا عامل ایجاد بیماری تب مالت هستند. مشخص شده است که ایمنی تیپ ۱ در کنترل عفونت بروسلایی نقش مهمی دارد. در این ارتباط ماکروفاژها نقش اساسی دارند. اینترلوکین ۱۰ که یک سایتوکاین تیپ ۲ است و سبب غیرفعال کردن ماکروفاژها می‌گردد، دارای اثرات معکوس بر بیماری می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که پلی مورفیسم‌های ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ بر تولید این سایتوکاین تأثیر می‌گذارند. در این مطالعه ما ارتباط بین این پلی مرفیسم‌ها بر روی استعداد ابتلا به بیماری تب مالت را بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۹۰ بیمار مبتلا به تب مالت و ۸۱ دامدار سالم که دام آلوده داشته و محصولات لبنی آلوده آن‌ها را مصرف می‌نمودند، مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی افراد جهت پلی مرفیسم‌های دو آللی ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ در موقعیت‌های ۱۰۸۲- (G/A)، ۸۱۹- (T/C) و ۵۹۲- (A/C) به روش PCR-RFLP ژنوتیپ گردیدند.

یافته‌ها: توزیع ژنوتیپ‌های CC و آلل‌های C در موقعیت‌های ۸۱۹- و ۵۹۲- ژن اینترلوکین ۱۰ بطور حائز اهمیتی در بیماران بیشتر از دامداران سالم بود (*P* به ترتیب برابر ۰/۰۳۴ و ۰/۰۰۸). هاپلوتیپ‌های تکی و دوتایی ATA به طور حائز اهمیتی در گروه کنترل بیشتر از بیماران بود (*P* به ترتیب برابر ۰/۰۲۷۸ و ۰/۰۱۳).

نتیجه‌گیری: فراوانی‌های بالاتر آلل‌های C در موقعیت‌های ۸۱۹- و ۵۹۲- ژن اینترلوکین ۱۰ و فراوانی کمتر هاپلوتیپ ATA/ATA در بیماران به عنوان عوامل مستعدکننده بیماری تب مالت مطرح می‌شوند.

واژگان کلیدی: بروسلا، اینترلوکین ۱۰، پلی مرفیسم ژن، سیستم ایمنی

دریافت مقاله: ۸۶/۸/۱۳ - پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۸

* شیراز، بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی استاد البرزی، گروه ایمنی شناسی
Email :rasouliman@yahoo.com

مقدمه

تب مالت یک عفونت مزمن گرانولوماتوزی است که توسط باکتری‌های گرم منفی داخل سلولی اختیاری بنام بروسلا (Brucella) ایجاد می‌گردد. این باکتری‌ها به ماکروفاژها وارد شده و در سلول‌های رتیکولواندوتلیال تکثیر می‌یابند. بروسلا عامل مولد بیماری در حیوانات اهلی و برخی از حیوانات وحشی است. انتقال باکتری به انسان از طریق مصرف محصولات لبنی غیرپاستوریزه و آلوده، تماس مستقیم با اجزا مختلف حیوان آلوده و استنشاق ذرات معلق آلوده صورت می‌گیرد. این بیماری مشترک بین انسان و حیوان، در سراسر دنیا گسترش داشته و منجر به مرگ ومیرهای بالایی در انسان شده است. ایران یک منطقه اندمیک برای بیماری تب مالت بوده به‌طوری‌که ۱۷۷۶۵ مورد جدید بیماری در سال ۲۰۰۳ گزارش شده است (۳-۱).

ایمنی سلولی (Cell-mediated immunity) نقش مهمی در پاسخ ایمنی بر ضد عفونت بروسلایی دارد (۴ و ۵). در واقع ایمنی سلولی تولید سایتوکاین‌هایی را القاء نموده که ماکروفاژها را جهت فعالیت‌های ضد بروسلایی فعال می‌نمایند. تحقیقات نشان داده که انتقال غیرفعال سلول‌های T (CD4+ ، CD8+)، سبب محافظت موثر در موش‌ها می‌گردد (۷-۵). به علاوه مطالعات متعددی ثابت نموده که سایتوکاین‌های تیپ ۱ ایمنی (Th1) از قبیل اینترفرون گاما (IFN-γ) نقش مهمی در کنترل بیماری ایفا می‌نمایند (۱۰-۸). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که موش‌هایی که ژن اینترفرون گاما آن‌ها حذف شده قادر به کنترل بیماری نبوده و خیلی زود از بین می‌روند (۱۱). ردریگز-زاپاتا (Rodriguez-Zapata) و همکارانش نشان دادند که لنفوسیت‌های T تحریک شده با PHA[1] در مبتلایان به تب مالت حاد که تحت درمان واقع نشده‌اند در تولید سایتوکاین اینترفرون گاما دچار نقص می‌باشند (۱۲).

سایتوکاین‌های تیپ ۲ ایمنی (Th2) اثرات اینترفرون گاما در فعال سازی ماکروفاژها را آنتاگونیزه می‌نمایند. یکی از سایتوکاین‌های Th2، اینترلوکین ۱۰ (IL-10) می‌باشد که تولید اینترفرون گاما را کاهش داده و سبب فروتنظیمی در مکانیسم‌های مؤثر Th1 می‌گردد. فرناندز (Fernandes) و همکاران نشان دادند با خنثی سازی اینترلوکین ۱۰ توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، تولید اینترفرون گاما افزایش می‌یابد و همچنین قدرت لیز کنندگی سلول‌های طحالی علیه باکتری بروسلا آبورتوس بیشتر می‌گردد (۱۳). به علاوه اثرات فروتنظیمی اینترلوکین ۱۰ در سیستم ایمنی مبتلایان به عفونت‌های باکتریایی داخل سلولی (۱۴ و ۱۵) و انگلی (۱۶ و ۱۷) نیز دیده شده است.

تفاوت‌های عمده‌ای در توانایی تولید اینترلوکین۱۰ به دنبال تحریک لیپوپلی ساکاریدی سلول‌های مونونوکلئاز خون محیطی در افراد مختلف دیده شده است (۱۸). به علاوه نشان داده شده که میزان تولید بسیاری از سایتوکاین‌ها تحت کنترل عوامل ژنتیکی بوده و پلی مرفیسم ژن‌های سایتوکاینی جهت پیشگویی استعداد ژنتیکی ابتلا به بیماری یا علائم کلینیکی بیماری حائز اهمیت می‌باشند (۱۹ و ۲۰). ازطرفی چندین پلی‌مرفیسم عملکردی (Functional) برای ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ گزارش شده است. پلی‌مرفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در نواحی ۵۹۲-(A/C) ، ۸۱۹-(T/C)

[1] Pulmonary Hypertension Association

و ۱۰۸۲- (G/A) از محل شروع نسخه برداری ژن اینترلوکین ۱۰ دیده شده که دارای همبستگی نامتعادل (Disequilibrium linkage) بوده و عامل هاپلوتیپ‌های مختلفی می‌باشند (۲۱ و ۲۲). ارتباط حداقل یکی از این پلی مرفیسم‌های تک نوکئوتیدی با بیماری‌های مختلف گزارش شده است (۲۸-۲۳). در این تحقیق با توجه به نقش مهم اینترلوکین ۱۰، جهت یافتن ارتباط احتمالی بین پلی مرفیسم ژن اینترلوکین ۱۰ و استعداد ابتلا به بیماری تب مالت، ما پلی‌مرفیسم‌های دوآللی عملکردی در ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ را میان جمعیت‌های ایرانی که در استان فارس زندگی می‌کنند را بررسی نمودیم.

مواد و روش‌کار

الف- گروه‌های مورد مطالعه

در بررسی‌های مورد مطالعه در این تحقیق، ۱۹۰ بیمار (۸۲ مرد و ۱۰۸ زن در رده سنی ۸۰-۷ سال) مبتلا به بیماری تب مالت فعال و ۸۱ دامدار سالم غیرخویشاوند با بیماران (۳۹ مرد و ۴۲ زن در رده سنی ۷۴-۵ سال) مورد مطالعه واقع شدند. بیماران از میان ۶۰۰ موردی که در مرکز بهداشت استان فارس ثبت نام نموده بودند به طور تصادفی انتخاب شدند. خون‌گیری از بیماران پس از مراجعه به محل اقامت، گرفتن رضایت نامه و پر کردن فرم اطلاعاتی از آنها صورت گرفت. تمامی بیماران، کشاورزانی بودند که حیوان مبتلا به بیماری را نگهداری می‌کردند یا افرادی بودند که تاریخچه مصرف شیر و محصولات لبنی غیر پاستوریزه داشتند. بیماری تب مالت بر اساس یافته‌های کلینیکی (مثل تب، عرق شبانه، ضعف، بی قراری، کاهش وزن، بزرگی طحال، تورم غدد لنفاوی، درد عضلانی و درد مفاصل)، مثبت بودن کشت خون و تست‌های سرولوژی تعیین گردید. تیتر برابر یا بیشتر از ۱/۱۶۰ تست آگلوتیناسیون استاندارد (SAT≥1/160) و تیتر مساوی یا بالاتر از ۱/۱۶۰ تست ۲-مرکاپتواتانول (2ME) در زمان عفونت به عنوان تست‌های سرولوژی مثبت در نظر گرفته شدند.

گروه کنترل بطور تصادفی از میان دامداران سالمی انتخاب شدند که تماس نزدیکی با حیوان آلوده به بروسلا داشتند و محصولات لبنی یا شیر حیوان آلوده را مصرف کرده بودند. ناحیه زیستی گروه سالم همانند گروه بیمار بود. گروه کنترل به مدت ۶ ماه تحت نظر قرار گرفتند ولی هیچ گونه علائم کلینیکی را نشان ندادند. بیماری تب مالت در حیوانات آنها توسط تست‌های سرولوژیکی در آزمایشگاه سازمان دامپزشکی استان فارس به تأیید رسیده بود.

ب- ژنوتیپ

DNA از نمونه‌های خون حاوی ضد انعقاد با روش Salting out استخراج گردید (۲۹). ژنوتیپ ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین۱۰ در موقعیت‌های ۱۰۸۲- ، ۸۱۹- و۵۹۲- به روش PCR-RFLP انجام شد. توالی پرایمرهای اینترلوکین ۱۰ در جدول ۱ نشان داده شده است. PCR در حجم ۱۰میکرولیتر انجام شد که جزئیات در جدول ۲ نشان داده شده است. محصولات PCR اینترلوکین ۱۰ مربوط به منطقه ۱۰۸۲- (G/A) توسط آنزیم Mnl I به دو قطعه ۱۰۶ و ۳۳ جفت باز، ۸۱۹-(T/C) توسط Mae III به دو قطعه ۱۲۵ و ۸۴ جفت بازی و

۵۹۲- (A/C) توسط Rsa I به قطعات ۲۳۶ و ۱۷۶ جفت بازی شکسته گردیدند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای بکار رفته جهت تعیین پلی مرفیسم‌های ژن اینترلوکین ۱۰

لوکوس	پرایمرها
اینترلوکین ۱۰ (-۵۹۲)	5'-CCTAGGTCACAGTGACGTGG-3' 5'-GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3'
اینترلوکین ۱۰ (-۸۱۹)	5'-TCATTCTATGTGCTGGAGATGG-3' 5'-TGGGGGAAGTGGGTAAGAGT-3'
اینترلوکین ۱۰ (-۱۰۸۲)	5'-CTCGCTGCAACCCAACTGGC-3' 5'-TCTTACCTATCCCTACTTCC-3'

محصولات شکسته شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جدا شدند و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط ترانس‌ایلومیناتور (transilluminator) مورد مطالعه قرار گرفتند.

فراوانی آللی و ژنوتیپی بر روی گروه‌های کنترل و بیمار با شمارش ژنوتیپ‌ها صورت گرفت. بررسی آماری در تفاوت بین گروه‌ها با تست مربع کای و بکارگیری نرم افزار EPI 2000 و SPSS نسخه ۱۳ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ به عنوان جواب حائز اهمیت در نظر گرفته شد. توان مطالعه (Study power) برای هر آلل و ژنوتیپ محاسبه گردید.

جدول ۲: شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) برای تکثیر لوکوس‌های ژن اینترلوکین۱۰

لوکوس	شرایط PCR
اینترلوکین ۱۰ (-۵۹۲)	94°C(5m); 35 cycle: 94°C(1m), 63°C(70s) , 72°C(1m); 72°C (10m) 250 ng DNA, 200 µmol dNTPs, 5.5 mM $MgCl_2$
اینترلوکین۱۰ (-۸۱۹)	94°C(5m);30cycle:94°C(45m),60°C(45s),72°C(1m),72°C(1m);72°C (5m)250 ng DNA, 200 µmol dNTPs, 3.2 mM $MgCl_2$
اینترلوکین۱۰ (-۱۰۸۲)	95°C(10m); 35 cycle : 95°C(30s), 61°C(45s), 72°C(60s);72°C(10m) 250 ng DNA, 200 µmol dNTPs, 2 mM $MgCl_2$

یافته‌ها

ژنوتیپ‌های اینترلوکین ۱۰ در ۱۹۰ بیمار و ۸۱ فرد سالم بررسی شدند. فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که فراوانی آلل‌های C در موقعیت‌های ۵۹۲- و ۸۱۹- ژن اینترلوکین ۱۰ در بیماران به طور حائز اهمیتی بالاتر از گروه کنترل است (study power=٪۷۲، ٪۹۵CI=۰/۸۴-۰/۹۷، OR=۱/۷، P=۰/۰۰۸۶). ژنوتیپ‌های CC ژن اینترلوکین ۱۰ نیز در موقعیت‌های ۵۹۲- و ۸۱۹- بطور حائز اهمیتی در بیماران بیشتر از کنترل بود (study power= ٪۵۷، ۱/۳۸-۱/۱۸=٪۹۵CI، OR=۱، P=۰/۰۳۴). فراوانی ژنوتیپ‌های AA و TT برای پلی مرفیسم‌های

ژن اینترلوکین ۱۰ در موقعیت‌های به ترتیب ۵۹۲- و ۸۱۹- در گروه کنترل بیشتر از بیماران بود (study power= ٪۵۴، ٪۹۵CI=۰/۶۲-۱/۰۴، OR=۰/۱۱، P=۰/۰۱۳).

جدول ۳: فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های اینترلوکین ۱۰ در مبتلایان به تب مالت و گروه کنترل

ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها	*گروه بیماران	*گروه کنترل	ζ P.Value
اینترلوکین۱۰ (۱۰۸۲-)			
ژنوتیپ‌ها			
GG	۲۸(۱۴/۷)	۶(۷/۴)	۰/۰۹۵
GA	۷۲(۳۷/۸)	۳۲(۳۹/۵)	۰/۸۰
AA	۹۰(۴۷/۳)	۴۳(۵۳)	۰/۳۸۸
آلل‌ها			
G	۱۲۸(۳۳/۶)	۴۴(۲۷/۱)	۰/۱۳۵
A	۲۵۲(۶۶/۳)	۱۱۸(۷۲/۸)	
اینترلوکین۱۰ (۸۱۹-)			
ژنوتیپ‌ها			
TT	۸(۴/۲)	۱۰(۱۲/۳)	۰/۰۱۳۸
TC	۷۸(۴۱)	۳۸(۴۶/۹)	۰/۳۷
CC	۱۰۴(۵۴/۷)	۳۳(۴۰/۷)	۰/۰۳۴۸
آلل‌ها			
T	۹۴(۲۴/۷)	۵۸(۳۵/۸)	۰/۰۰۸۶
C	۲۸۶(۷۵/۳)	۱۰۴(۶۴/۱)	
اینترلوکین۱۰ (۵۹۲-)			
ژنوتیپ‌ها			
AA	۸(۴/۲)	۱۰(۱۲/۳۴)	۰/۰۱۳۸
AC	۷۸(۴۱)	۳۸(۴۶/۹)	۰/۳۷
CC	۱۰۴(۵۴/۷)	۳۳(۴۰/۷)	۰/۰۳۴۸
آلل‌ها			
A	۹۴(۲۵/۷)	۵۸(۳۶)	۰/۰۰۸۶
C	۲۸۶(۷۵)	۱۰۴(۶۴)	

* اعداد به صورت (درصد) تعداد هستند.

ζ هر P حاصل مقایسه ردیف مربوطه با مجموع ردیف‌های مرتبط با آن می‌باشد.

جدول۴ فراوانی هاپلوتیپ‌های اینترلوکین ۱۰ را نشان می‌دهد. هاپلوتیپ دوتایی (Double haplotypes) اینترلوکین۱۰ به صورت ATA/ATA در کنترل‌ها به نحو چشمگیری بالاتر از بیماران بود (study power= ٪۵۴، ٪۹۵CI=۰/۶۲-۱/۰۴، OR=۰/۱۱، P=۰/۰۱۳). به علاوه هاپلوتیپ تکی (Single haplotypes) ATA در بیماران کمتر ازگروه کنترل بود (study power= ٪۳۲، ۰/۹۷-، ٪۹۵CI=۰/۶۴، OR=۰/۴۲، P=۰/۰۲۷).

جدول ۴: توزیع هاپلوتیپی اینترلوکین ۱۰ در بیماران مبتلا به تب مالت و گروه کنترل

هاپلوتیپ‌ها (۵۹۲-، ۸۱۹-، ۱۰۸۲-)	*گروه بیماران	*گروه کنترل	ζ P.Value
هاپلوتیپ تکی			
GCC	۱۲۸(۳۳/۷)	۴۴(۲۷/۲)	۰/۱۳۵
ACC	۱۵۸(۴۱/۶)	۶۳(۳۸/۹)	۰/۵۵۹
ATA	۹۴(۲۴/۷)	۵۵(۳۳/۹)	۰/۰۲۷۸
هاپلوتیپ دوتایی			
GCC/GCC	۲۸(۱۴/۷۴)	۶(۷/۴۱)	۰/۳۷
GCC/ACC	۴۷(۲۴/۷۴)	۱۶(۱۹/۷۵)	۰/۶۷
GCC/ATA	۲۵(۱۳/۱۶)	۱۶(۱۹/۷۵)	۰/۴۴
ACC/ACC	۲۹(۱۵/۲۶)	۱۴(۱۷/۲۸)	۰/۰۹۵
ATA/ATA	۸(۴/۲۱)	۱۰(۱۲/۳۵)	۰/۰۱۳۸
ACC/ATA	۵۳(۲۷/۸۹)	۱۹(۲۳/۴۶)	۰/۱۶۵

* اعداد به صورت (درصد) تعداد هستند.

ζ هر P حاصل مقایسه ردیف مربوطه با مجموع ردیف‌های مرتبط با آن می‌باشد.

بحث

مقاومت بر علیه گونه‌های بروسلا بستگی به پاسخ مناسب سلول T و تولید سایتوکاین‌های اینترفرون گاما (IFN-γ) و اینترلوکین ۱۲ (IL-12) دارد (۳۰ و ۳۱). در واقع محافظت میزبان در برابر باکتری بروسلا به طور اولیه توسط پاسخ‌های ایمنی Th1 ایجاد می‌گردد.

سلول‌های Th1 که سایتوکاین اینترفرون گاما را ترشح می‌کنند واسطه برقراری ایمنی سلولی (CMI) هستند در حالی که سلول‌های Th2 سایتوکاین‌های اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۱۰ را ترشح نموده و پاسخ‌های با تیتر بالای آنتی‌بادی ایجاد می‌نمایند و اغلب شرایط را جهت ابتلا به عفونت بروسلایی مستعد می‌نمایند (۳۲). اینترلوکین ۱۰ باعث کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی (Proinflammatory) مثل اینترلوکین ۱۲ شده و فعالیت ماکروفاژ را طی عفونت مهار می‌نماید. در مدل‌های موشی نشان داده شده که اینترلوکین ۱۰ در گسترش بیماری تب مالت نقش مهمی دارد که علت آن فروتنظیمی پاسخ‌های سلول Th1 و کاهش ترشح سایتوکاین اینترفرون گاما ذکر شده است (۱۳). بعلاوه مدارکی بر فروتنظیمی سیستم ایمنی توسط سایتوکاین اینترلوکین ۱۰ در مبتلایان به عفونت‌های باکتریایی داخل سلولی و انگلی نیز وجود دارد (۱۷-۱۴).

عوامل متعددی بر نتیجه برخورد انگل با میزبان (Host-pathogen interaction) تاثیر می‌گذارند که یکی از آن‌ها عامل ژنتیک میزبان می‌باشد. ژن‌های سایتوکاینی می‌توانند کاندید خوبی برای مطالعات ژنتیکی استعداد میزبان به بیماری تب مالت باشند و در این زمینه گزارش‌های متعددی دال بر نقش احتمالی پلی مرفیسم این ژن‌ها در استعداد ابتلا به این بیماری وجود دارد (۲۸ و ۳۸-۳۳).

چندین جایگاه پلی‌مرفیک در ناحیه پروموتر اینترلوکین ۱۰ دیده شده که شامل ۱۰۸۲-، ۸۱۹- و ۵۹۲- از ناحیه شروع نسخه‌برداری می‌باشد (۲۱ و ۲۲). به علاوه ارتباط پلی مرفیسم‌های ژن اینترلوکین ۱۰ با بیماری‌های مختلف بررسی شده است (۴۶-۳۹، ۲۸-۲۳). باوجود این، نتایج متناقضی در مورد اثرات عملکردی این سه پلی مرفیسم دو آللی بر تولید اینترلوکین ۱۰ یا استعداد ابتلا به بیماری گزارش شده است. سافیان (Safyan) و همکاران نشان دادند که افزایش تولید اینترلوکین ۱۰ در بیماران مبتلا به بیماری فابری (Fabry disease) به علت فزونی آلل‌های C در موقعیت‌های ۸۱۹- و ۵۹۲- ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ۱۰ در بیماران می‌باشد (۴۲). ناکادا (Nakada) و همکاران گزارش نمودند که فراوانی ژنوتیپ CC در موقعیت ۵۹۲- اینترلوکین ۱۰ با علائم وخیم سپتی سمی (Sepsis) در ارتباط است (۲۷). ارتباط مهمی بین عفونت حاد برونشی ناشی از ویروس RSV[2] و آلل C در موقعیت ۵۹۲- ژن اینترلوکین ۱۰ کودکان بستری گزارش شده است (۲۶).

در این مطالعه، ما ارتباط بین پلی مرفیسم ژن اینترلوکین ۱۰ در موقعیت‌های ۱۰۸۲-، ۸۱۹- و ۵۹۲- را با استعداد ابتلا به بیماری تب مالت بررسی نمودیم. نتایج نشان داد که توزیع ژنوتیپ‌های CC و آلل‌های C در موقعیت‌های ۵۹۲- و ۸۱۹- در بیماران به طور حائز اهمیتی بیشتر از گروه کنترل بوده است. ولی ژنوتیپ AA و TT به ترتیب در موقعیت‌های ۵۹۲- و ۸۱۹- در بیماران به طور حائز اهمیتی کمتر از کنترل بود. مطالعات متعددی نشان داده که ژنوتیپ‌های CC و آلل‌های C در نواحی ۸۱۹- و ۵۹۲- ژن اینترلوکین ۱۰ با تولید بیشتر سایتوکاین اینترلوکین ۱۰ در ارتباط هستند (۴۲ و ۴۶). بنابراین با توجه به این نتایج، تصور می‌شود افرادی که ژنوتیپ‌های CC یا آلل‌های C را در موقعیت‌های ذکر شده ژن اینترلوکین ۱۰ به ارث می‌برند احتمالاً توانایی تولید مقادیر بالای اینترلوکین ۱۰ را دارند که در خصوص عفونت

[2] Respiratory Syncytial Virus

بروسلایی سبب ایجاد پاسخ‌های ایمنی غیرمؤثر شده و بیمار را در ابتلا به بیماری مستعدتر می‌نماید.

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده، هاپلوتیپ ATA به صورت تکی یا دوتایی به طور حائز اهمیتی در گروه کنترل در مقایسه با بیماران بیشتر است. به علاوه، مطالعات نشان داده که هاپلوتیپ ATA/ATA با تولید کمتر اینترلوکین ۱۰ در ارتباط است (۴۷ و ۴۸). بنابراین در این مطالعه شاید بتوان چنین استباط کرد که افرادی که دارای هاپلوتیپ دوتایی ATA/ATA هستند، بدلیل تولید کمتر اینترلوکین۱۰ قادر به القاء پاسخ ایمنی مؤثر علیه بروسلا بوده و در نتیجه قادر به کنترل عفونت می‌باشند.

پلی‌مرفیسم‌های اینترلوکین۱۰ در بیماران مبتلا به بیماری تب مالت در جمعیت‌های اسپانیایی و ترک نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۲۸ و ۳۸). براوو (Bravo) و همکاران در اسپانیا نشان دادند که در توزیع ژنوتیپ‌های مختلف اینترلوکین ۱۰ بین افراد سالم و بیمار تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود ندارد (۳۸). این محققین نتیجه گرفتند که ژنوتیپ‌های مختلف این سایتوکاین در استعداد ابتلا به بیماری، محافظت در برابر بیماری یا گسترش بیماری تب مالت تأثیری ندارد. ولی بوداک (Budak) و همکاران در ترکیه مشاهده نمودند که پلی مرفیسم‌های ژن اینترلوکین ۱۰ که با تولید متوسط و یا زیاد این سایتوکاین درارتباط می‌باشد (GCC/ATT)، در بیماران در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است (۲۸). آنها حدس زدند افرادی که این هاپلوتیپ‌ها را دارا می‌باشند در ابتلا به بیماری تب مالت مستعدتر هستند.

تفاوت‌های مشاهده شده بین نتایج ما و براوو (۳۸) ممکن است مربوط به تفاوت‌های نژادی باشد. به‌طوری که گروه‌های مورد مطالعه ما از جمعیت فارس-آریایی بودند که در جنوب ایران زندگی می‌کنند ولی گروه مورد مطالعه براوو اسپانیایی بودند. به علاوه نحوه انتخاب گروه کنترل نیز ممکن است در ایجاد اختلافات نقش داشته باشد؛ به‌طوری که گروه کنترل در مطالعه ما افراد سالمی بودند که در تماس مستقیم با حیوانات آلوده قرار داشتند و یا محصولات لبنی آلوده آنها را مصرف می‌نمودند، در حالی که گروه کنترل براوو فقط شامل داوطلبان سالمی بودند که همانند گروه بیمار در یک ناحیه جغرافیایی زندگی می‌کردند. نتایج بوداک گرچه ارتباطی بین پلی‌مرفیسم اینترلوکین ۱۰ و استعداد ابتلا به بیماری تب مالت را نشان می‌دهد ولی نتایج آن‌ها با ما متفاوت است (۲۸). این اختلافات ممکن است مربوط به انتخاب گروه کنترل یا اختلافات نژادی باشد (گروه‌های مورد مطالعه بوداک ترک بودند). به علاوه اختلاف در تعداد نمونه نیز ممکن است مؤثر باشد (بوداک ۴۰ بیمار و ۵۰ کنترل را مورد مطالعه قرار داده است). از طرف دیگر هیچ کدام از این دو محقق نتایج مربوط به اطلاعات ژنوتیپی و آللی را نشان نداده بودند، در نتیجه مقایسه بیشتر بین مطالعه حاضر و این دو مطالعه مشابه امکان‌پذیر نبود.

پلی‌مرفیسم‌های اینترلوکین ۱۰ در ارتباط با چند بیماری نیز بین جمعیت ایرانی مورد مطالعه قرار گرفته است. در این رابطه، کمالی سروستانی و همکاران حضور نوکلئوتید G در موقعیت ۱۰۸۲- از ژن اینترلوکین ۱۰ را به عنوان یک عامل مستعدکننده برای گسترش بیماری پری اکلامپسی در خانم‌ها در نظر گرفتند (۴۳). این محققین در مطالعه دیگر حضور ژنوتیپ CC در موقعیت ۵۹۲- ژن اینترلوکین ۱۰ و ارتباط آن با بیماری سقط خودبخودی مکرر در خانم‌ها را نشان دادند (۴۴). امیرزرگر و همکاران

پلی‌مرفیسم‌های ژن اینترلوکین ۱۰ در بیماران مبتلا به لوکمی حاد میلوئیدی (CML) را بررسی نمودند. آنها نشان دادند که فراوانی هاپلوتیپ ACC بطور حائز اهمیتی در بیماران بیشتر از گروه کنترل است (۴۵). تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه بین فراوانی هاپلوتیپی اینترلوکین ۱۰ در گروه‌های کنترل مطالعه ما با مطالعه امیرزرگر تفاوت آماری حائز اهمیتی را نشان نداد. به علاوه مقایسه فوق، بین گروه کنترل مورد مطالعه کمالی سروستانی و مطالعه ما نیز صورت گرفت ولی تفاوت حائز اهمیتی دیده نشد.

در نهایت بر اساس یافته‌های فوق، ما حدس می‌زنیم که ژنوتیپ‌های CC و آلل‌های C در موقعیت‌های ۸۱۹- و ۵۹۲- اینترلوکین ۱۰، عوامل مستعد کننده و مؤثری در ابتلا به بیماری تب مالت باشند و هاپلوتیپ ATA/ATA (۵۹۲-، ۸۱۹-، ۱۰۸۲-) اینترلوکین ۱۰ سبب مقاوت بیشتر به عامل عفونی می‌گردد. در نتیجه به نظر ما فراوانی‌های بالا و حائز اهمیت ژنوتیپ‌های CC یا آلل‌های C در موقعیت‌های ۸۱۹- و ۵۹۲- اینترلوکین ۱۰ در این مطالعه منجر به تولید بیشتر اینترلوکین ۱۰ شده که نقش مهمی در القاء بیماری داشته است. به علاوه هاپلوتیپ ATA/ATA منجر به تولید کمتر سایتوکاین شده و احتمالاً سبب مهار بیماری گشته است. با وجود این، ما جهت وضوح بیشتر ارتباط این بیماری و پلی‌مرفیسم‌های ژن اینترلوکین ۱۰ مطالعات بیشتر در سایر نقاط ایران را پیشنهاد می‌نماییم. همچنین بررسی‌های بیشتر در ارتباط بین این پلی-مرفیسم‌ها و توانایی تولید اینترلوکین ۱۰ در جمعیت-های مبتلا به تب مالت را توصیه می‌کنیم.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از آقایان محمدعلی دهیادگاری و امین عباسیان برای همکاری صمیمانه‌شان قدردانی می‌کنند. همچنین از آقایان دکتر قره‌چاهی و دکتر حسن شاهیجانی در مرکز بهداشت استان فارس برای همکاری در بیماریابی سپاسگزاری می‌نمایند. در ضمن در اختیار قرار گرفتن اطلاعات مربوط به دام‌های آلوده توسط سازمان دامپزشکی استان فارس مورد امتنان این گروه پژوهشی می‌باشد. این مطالعه از نظر مالی توسط مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز طی طرح مصوب به شماره ۱-۸۱ حمایت شده است.

References:

1. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, et al. Brucellosis. N Engl J Med 2005;352:23, 25 - 36.
2. Hasanjani Roushan MR, Mohrez M, Smailnejad Gangi SM, et al. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran. Epidemiol Infect 2004;132:1109-14.
3. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol 2002;90:81-110.
4. Serre A, Bascoul S, Vendrell JP, et al. Human immune response to Brucella infection. Ann Inst Pasteur Microbiol 1987;138:113-7.
5. Araya LN, Elzer PH, Rowe GE, et al. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with Brucella abortus. J Immunol 1989;143:3330-7.
6. Araya LN, Winter AJ. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of Brucella abortus by passive transfer of immune T cells or serum. Infect Immun 1990;58:254-6.
7. Cheers C. Pathogenesis and cellular immunity in experimental murine brucellosis. Dev Biol Stand 1984;56:237-46.
8. Jiang X, Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of Brucella abortus. Infect Immun 1993; 61:124-34.

9. Jones SM, Winter AJ. Survival of virulent and attenuated strains of Brucella abortus in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. Infect Immun 1992;60:3011-4.
10. Baldwin CL, Parent M. Fundamentals of host immune response against Brucella abortus: what the mouse model has revealed about control of infection. Vet Microbiol 2002;90:367-82.
11. Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, et al. Interferon-gamma is crucial for surviving a Brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. Immunology 2001;103:511-8.
12. Rodriguez-Zapata M, Salmeron I, Manzano L, et al. Defective interferon-gamma production by T-lymphocytes from patients with acute brucellosis. Eur J Clin Invest 1996;26:136-40.
13. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus. Infect Immun 1995;63:1130-3.
14. Bermudez LE, Champsi J. Infection with Mycobacterium avium induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. Infect Immun 1993;61:3093-7.
15. Wagner RD, Maroushek NM, Brown JF, et al. Treatment with anti-interleukin-10 monoclonal antibody enhances early resistance to but impairs complete clearance of Listeria monocytogenes infection in mice. Infect Immun 1994;62:2345-53.
16. Sher A, Fiorentino D, Caspar P, et al. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. J Immunol 1991;147:2713-6.
17. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al. Interleukin-10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. J Exp Med 1992;175:169-74.
18. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, et al. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. Lancet 1997;349:1912-3.
19. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. Genes Immun 2002;3:313-30.
20. Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. Annu Rev Immunol 1998; 16: 593-617.
21. Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, et al. Interleukin-10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:9465-70.
22. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet 1997;24:1-8.
23. Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. J Gastroenterol Hepatol 2006;21:1163-9.
24. Helminen ME, Kilpinen S, Virta M, et al. Susceptibility to primary Epstein- Barr virus infection is associated with interleukin-10 gene promoter polymorphism. J Infect Dis 2001;184:777-80.
25. Oral HB, Budak F, Uzaslan EK, et al. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. Cytokine 2006;35:143-7.
26. Hoebee B, Bont L, Rietveld E, et al. Influence of promoter variants of interleukin-10, interleukin-9, and tumor necrosis factor-alpha genes on respiratory syncytial virus bronchiolitis. J Infect Dis 2004;189:239-47.
27. Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, et al. Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. J Surg Res 2005;129:322-8.
28. Budak F, Göral G, Heper Y, et al. IL-10 and IL-6 gene polymorphisms as potential host susceptibility factors in Brucellosis. Cytokine 2007;38:32-6.
29. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16:1215.
30. Zhan Y, Liu Z, Cheers C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium Brucella abortus by different mechanisms. Infect Immun 1996;64:2782-6.
31. Zhan Y, Cheers C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to Brucella abortus infection. Infect Immun 1995;63:1387-90.
32. Golding B, Zaitseva M, Golding H. The potential for recruiting immune responses toward type 1 or type 2 T cell helps. Am J Trop Med Hyg 1994;50:33-40.

33. Rasouli M, Kiany S. Association of interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms with susceptibility to brucellosis in Iranian patients. Cytokine 2007;38:49-53.
34. Caballero A, Bravo MJ, Nieto A, et al. TNFA promoter polymorphism and susceptibility to brucellosis. Clin Exp Immunol 2000;121:480-3.
35. Rafiei A, Hajilooi M, Shakib RJ, et al. Transforming growth factor-beta1 polymorphisms in patients with brucellosis: an association between codon 10 and 25 polymorphisms and brucellosis. Clin Microbiol Infect 2007;13:97-100.
36. Hajilooi M, Rafiei A, Reza Zadeh M, et al. Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and susceptibility to human brucellosis. Tissue Antigens 2006;68:331-4.
37. Davoudi S, Amirzargar AA, Hajiabdolbaghi M, et al. Th-1 cytokines gene polymorphism in human brucellosis. Int J Immunogenet 2006;33:355-9.
38. Bravo MJ, de Dios Colmenero J, Alonso A, et al. Polymorphisms of the Interferon-gamma and interleukin-10 genes in human brucellosis. Eur J Immunogenet 2003;30:433-5.
39. Zhu QR, Ge YL, Gu SQ, et al. Relationship between cytokines gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection. Chin Med J. 2005;118:1604-9.
40. Courtin D, Argiro L, Jamonneau V, et al. Interest of tumor necrosis factor-alpha -308 G/A and interleukin-10 -592 C/A polymorphisms in human African trypanosomiasis. Infect Genet Evol 2006; 6:123-9.
41. Shin HD, Park BL, Kim YH, et al. Common interleukin-10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. Exp Mol Med 2005;37:128-32.
42. Safyan R, Whybra C, Beck M, et al. An association study of inflammatory cytokine gene polymorphisms in Fabry disease. Eur Cytokine Netw 2006;17:271-5.
43. Kamali-Sarvestani E, Kiany S, Gharesi-Fard B, et al. Association study of IL- 10 and IFN-gamma gene polymorphisms in Iranian women with preeclampsia. J Reprod Immunol 2006;72:118-26.
44. Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Gharesi-Fard B, et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. J Reprod Immunol 2005;65:171-8.
45. Amirzargar AA, Bagheri M, Ghavamzadeh A, et al. Cytokine gene polymorphism in Iranian patients with chronic myelogenous leukaemia. Int J Immunogenet 2005; 32:167-71.
46. Breen EC, Boscardin WJ, Detels R, et al. Non-Hodgkin's B cell lymphoma in persons with acquired immunodeficiency syndrome is associated with increased serum levels of IL-10, or the IL-10 promoter -592 C/C genotype. Clin Immunol 2003;109:119-29.
47. Bidwell J, Keen L,Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: online databases. Genes Immun 1999;1:3-19.
48. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: online databases, supplement 1. Genes Immun 2001;2:61-70.