دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وهفتم – شماره ۱۴۴
دی ۱۳۹۸

متیلاسیون ژن اینترفرون گاما در بیماران مواجهه یافته با سولفورموستارد

نویسندگان: اشرف وفا[۱]، سقراط فقیه‌زاده[۲]، سارا غفارپور[۳]،حسین بهبودی[٤]، محمد صابر زمانی[٥]، طوبی غضنفری[۱و۳*]

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی شاهد، تهران، ایران
۲. گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
۳. مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
٤. گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۵. گروه تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: طوبی غضنفری E-mail: tghazanfari@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۶
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۸/۰۹/۲۰
پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۱

چکیده

مقدمه و هدف: اینترفرون گاما یکی از سایتوکین‌های مهم در بروز بیماری‌های التهابی مزمن ریوی مانند آسم و COPD است. متیلاسیون نواحی CPG پروموتری این ژن می‌تواند تحت تاثیر موادشیمیایی و سمی مختلف دچار تغییرشود که این تغییرات در بروز بیماری‌های مزمن ریوی و شدت آن نقش دارد. در این مطالعه به بررسی اثر ماده شیمیایی سولفورموستارد بر وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن اینترفرون گاما و ارتباط آن با شدت بیماری ریوی در جانبازان شیمیایی با مشکلات تاخیری ریوی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۴۶ فرد مواجهه یافته با علائم خفیف تا متوسط ریوی، ۴۵ فرد مواجهه یافته با علائم شدید ریوی و ۴۱فرد مواجهه نیافته به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند.کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده از خون این افراد موردبررسی قرارگرفته و نمونه‌های مناسب پس از تیمار با بی‌سولفیت ازنظر وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن IFN-γ از طریق تست MSP مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: سطح متیلاسیون پروموتور ژن IFN-γ در گروه مواجهه یافته با مشکلات خفیف تا متوسط افزایش معناداری و در گروه مواجهه یافته با مشکلات شدیدکاهش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت. سطح فاکتورهای اسپیرومتری در افراد دارای DNA متیله بیش از افراد دارای DNA غیر متیله بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های به دست آمده می‌توان پیشنهاد داد که افزایش متیلاسیون نواحی پروموتوری و احتمالا تغییر بیان ژنIFN-γ در مواجهه یافتگان با گاز خردل می‌تواند تاثیر مثبتی بر روی عملکرد ریه داشته باشد.

واژگان کلیدی: اینترفرون گاما، سولفورموستارد، متیلاسیون، مشکلات ریوی

مقدمه

گاز موستارد یا سولفور موستارد[1](SM) یک ماده‌ی کشنده و سمی است (۱) که در جنگ جهانی اول و جنگ عراق علیه ایران (۳۸۷بار در سال‌های ۱۹۸۸-۱۹۸۰) استفاده شده است(۲). اگرچه مرگ‌ومیر ناشی از SM پایین است ولی دارای اثرات شدید بسیاری ازجمله عوارض حاد و مزمن تنفسی، چشمی، پوستی، فیزیولوژیک، هماتولوژیک، ایمنولوژیک، گوارشی و اندوکرین است که درنهایت کیفیت زندگی قربانیان را تحت تأثیر قرار می‌دهد(۳). بیش‌ترین عوارض بالینی ناشی از SM در ایران مشکلات ریوی است(٤) که مهم ترین آن‌ها شامل برونشیت مزمن، برونشیولیت (٥،٦)، آسم(٥)، بیماری انسدادی مزمن ریوی(COPD) (٧،٨)،آمفیزم، فیبروز ریوی(IPF) (٥،٩)، برونشیولیت آبلیترانس(BO)(١٠) و در مواجهه طولانی‌مدتسرطان ریه است(٤).

اینترفرون گاما (IFN-γ) سایتوکینی است با فعالیت ضدفیبروز که موجب مهار تولید کلاژن توسط فیبروبلاست‌ها می‌شود(١١) و تجویز آن در مدل موشی موجب کاهش فیبروز می‌شود(١٢). کاهش میزان IFN-γ در بیماری‌های ریوی مزمن می‌تواند در تجمع کلاژن نقش داشته باشد(١٣). از طرفی افزایش این سایتوکین موجب التهاب از نوع پاسخ ایمنی سلولی (افزایش TH1,CTL)وتولید سیتوکین‌های التهابی و تخریب بافت ریه می‌شود(١٤).

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی درزمینه اپی‌ژنتیک بخصوص متیلاسیون DNA و ارتباط آن با التهاب(١٥)، بیان ژن در بیماری‌های ریوی (١٦) و بیان سایتوکاین‌های التهابی (١٧) انجام‌شده است. در مقایسه متیلاسیون DNA در سلول‌های اپیتلیال آلوئولار در بیماران IPF و COPD، در بیماران IPF بیشتر هیپومتیلاسیون جزایر CPG مشاهده‌شده درحالی‌که در بیماران COPD بیشتر هیپرمتیلاسیون مشاهده گردیده است (١٨). مطالعات بر روی DNA سلول‌های اندوتلیال موش که در مواجهه با سولفور موستارد قرارگرفته بودند، تغییرات اپی‌ژنتیک به‌ویژه اختلال در متیلاسیون را نشان داده است (١٩). مطالعه و طبقه‌بندی این تغییرات پس از تماس با SM می‌تواند مکانیسم آن را آشکار کرده و یک استراتژی مناسب برای درمان بیماران مواجهه یافته با SM باشد(٢٠).

در تماس با مواد شیمیایی افزایش آشکاری در متیلاسیون جزایر CPG ژن IFN-γ دیده شده که موجب کاهش بیان این ژن شده است (٢١-٢٢). به‌عنوان‌مثال در بررسی اثر دی‌ایزوسیونات بر روی متیلاسیون ژن IFN-γ در بیماران مبتلابه آسم شغلی، در ٣ گروه مواجهه یافته با علائم اختصاصی، مواجهه یافته با علائم خفیف و مواجهه یافته فاقد علائم، افزایش قابل‌توجهی در متیلاسیون پروموتر این ژن در گروه اول مشاهده شده است(٢١). این مطالعه نشان می‌دهد که الگوی متیلاسیون این ژن می‌تواند در شدت‌های مختلف مشکلات ریوی متفاوت باشد.

با توجه به تاثیر پذیری پروموتر ژن IFN-γ نسبت به مواد شیمیایی و تغییر الگوی متیلاسیون این توالی در بیماران COPD، آسم و IPF، این مطالعه با هدف مقایسه سطح متیلاسیون ژن IFN-γ در جانبازان شیمیایی با شدت های مختلف مشکلات ریوی و افراد سالم و همچنین ارتباط بین متیلاسیون این ژن و شدت مشکلات ریوی در مواجهه یافتگان انجام شد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه دو گروه از جانبازان شیمیایی شامل ٤٥ نفر دارای مشکلات ریوی شدید و ٤٦ نفر دارای مشکلات ریوی خفیف تا متوسط از بین جانبازان شیمیایی دارای پرونده تایید شده توسط کمیسیون پزشکی جانبازان انتخاب گردیدند. همچنین ٤١ نفراز افراد سالم غیر شیمیایی به عنوان گروه شاهد وارد مطالعه گردیدند. معیار ورود به مطالعه در همه شرکت‌کنندگان، رنج سنی ٦٥-٣٥سال و توزیع یکسان سن، توزیع

[1]. Sulfurmustard

یکسان ازنظر فاکتورهای محیطی، شغل، سیگار، بیماری‌های زمینه‌ای و رضایت فرد برای مشارکت در مطالعه و تکمیل فرم رضایت می‌باشد. این مطالعه با به تایید کمیته اخلاق دانشگاه شاهد رسیده و کد اخلاق IR.SHAHED.REC.1397.009 را اخذ نموده است.

بررسی بالینی و گروه‌بندی افراد

پزشک عمومی یا متخصص داخلی وضعیت افراد گروه کنترل را بررسی کرده وسلامت افراد را از نظر نداشتن مشکلات ریوی تایید نمود.برای گروه مورد نیز ابتدا عدم وجود عفونت حاد طبق نظر پزشک متخصص بررسی شد؛سپس بیماران از نظر وضعیت بالینی ریه و شدت ضایعات ریوی دسته‌بندی شدند.گروه‌بندی آسیب‌های ریوی از نظر شدت، براساس پروتکل کمیسیون پزشکی جانبازان در ۲ گروه خفیف تا متوسط وشدید صورت گرفت.

استخراج DNA از نمونه خون و تهیه نمونه کاملا متیله و غیر متیله

DNA ژنومی از یک میلی لیتر خون حاوی ضد انعقاد EDTAبا استفاده از محلولDNG (سینا کلون، ایران) استخراج شد. برای سنجش کیفی و کمی DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (ترموساینتیفیک، ایالات متحده) استفاده شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب در A260/A280 و نسبت جذب A260/A230 آنها بین ۱.۸ تا ۲ بود به عنوان نمونه‌های مناسب انتخاب شدند.

جهت تهیه نمونه کاملا متیله از آنزیم CpG Methyltransferase (M.SssI) و نمونه کاملا غیر متیله از آنزیم Phi29 به روش تکثیر کامل ژنوم (هر دو ساخته شرکت Thermo Sientific، لیتوانی) استفاده شد. کار مطابق پروتوکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد.

تیمار DNA استخراج شده با بی‌سولفیت[1]

برای تیمار DNA با بی سولفیت از کیت EpiTect Bisulfite kit (کایاژن، آلمان) استفاده شد.تیمار نمونه ها مطابق دستورالعمل موجود در کیت،انجام شد. به ۲ میکروگرمDNA بافر بی‌سولفیت میکس اضافه گردید و نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (بایورد، ایالات متحده) انکوبه گردید. سپس فرآیند خالص‌سازی بر روی نمونه‌ها انجام گرفت و با استفاده از ستون و بافرهای شستشو ٤٠ میکرولیتر DNA بی سولفیت شده تخلیص شد.

انجام Methylation Specific PCR

از پرایمرهای طراحی شده درمقاله‌ی یانگ و همکاران (۲۳) برای جزیره CpG پروموتور ژن IFN-γ استفاده شد که در جدول ۱ آورده شده است. علت انتخاب این نواحی در پروموتور به‌عنوان توالی هدف، مهم بودن این نواحی در مطالعات انجام گرفته در زمینه‌ی متیلاسیون و قرار گرفتن این مناطق در جزایر CpG پروموتور بوده است. البته برای اطمینان کامل، پرایمرها با توالی ناحیه هدف مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای انجام تست PCR از مسترمیکس TEMPase Hot Start 2x Master mix A (امپلیکون، دانمارک) استفاده شد. برنامه دمایی و زمانی تست PCR شامل یک انکوباسیون ۱۵ دقیقه ای در دمای ۹۵درجه و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون ۳۰ ثانیه ای در دمای ۹۵ درجه، اتصال پرایمرها به DNA هدف (٦٩ درجه برای پرایمر متیله و ۷۰ درجه برای پرایمر غیر متیله) به مدت ۳۰ ثانیه و طویل سازی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، و طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR به ژل آگارز ۲ درصد انتقال یافت و نتایج کار توسط دستگاه ژل داک رویت شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری به وسیله نرم افزار SPSS ورژن ١٦ انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد از میانگین (SEM) نشان داده شد. تفاوت متغیرها با تستهای آماری مناسب شامل ANOVA، Student-t، Kruskal-Wallis و Mann-Whitney U بررسی شد. P-value کم تر از ۰.۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

[1]. Bisulfite Treatment

جدول ۱. توالی پرایمرهای IFN-γویژه MSP

پرایمر	توالی
F-IFN-γ M	5´-TTAGTATTTTGGGAGGTTAAGGC-3´
R-IFN-γ M	5´-CGAATAACTAAAACTACAAACACTCG-3´
F-IFN-γ U	5´-TAGTATTTTGGGAGGTTAAGGTGG-3´
R-IFN-γ U	5´-CCAAATAACTAAAACTACAAACACTCAC-3´
F: Forward, R: Reverse, M: Methylated, U: Unmethylated.	

نتایج

در این مطالعه از DNA استخراج شده از ٤٦ فرد مواجهه یافته با علائم خفیف تا متوسط ریوی، ٤٥ فرد مواجهه یافته با علائم شدید ریوی و تعداد ٤١ فرد مواجهه نیافته استفاده شد. میانگین سنی افراد گروه کنترل، ٤١.٧١ سال و میانگین سنی افراد گروه مواجهه یافته ٤٧.٦٦ سال بود.

افزایش معنی‌دار در شیوع متیلاسیون ژن IFN-γ در گروه خفیف تا متوسط به نسبت گروه کنترول و کاهش معناداری در شیوع متیلاسیون در گروه شدیدبه نسبت گروه کنترل و خفیف تا متوسط دیده شد.از نظر درصد متیلاسیون بین گروه کنترل و تمام افراد مواجهه یافته اختلاف معناداری دیده نمی‌شود(جدول۲).

جدول۲. تعداد افراد گروه مواجهه یافته و گروه کنترل براساس طبقه بندی بنیاد و درصد متیله و غیر متیله

		متیلاسیون					P-value
		کل	غیرمتیله		متیله		
		تعداد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
گروه	کنترل	۴۱	۸	٪۱۹.۵	۳۳	٪۸۰.۵	
	مواجهه یافته	۹۱	۲۹	٪۳۱.۹	۶۲	٪۶۸.۱	۰.۱۴۴
طبقه مشکلات ریوی	کنترل	۴۱	۸	٪۱۹.۵	۳۳	٪۸۰.۵	
	خفیف تا متوسط	۴۶	۱	٪۲.۲	۴۵	٪۹۷.۸	۰.۰۱۱
	شدید	۴۵	۲۸	٪۶۲.۲	۱۷	٪۳۷.۸	<۰.۰۰۱

میانگین سنی افرادارای DNA متیله و غیر متیله در هر دو گروه کنترل و مواجهه یافته اختلاف معناداری نشان نداد.از نظر فاکتورهای اسپیرومتری که در افراد مواجهه یافته انجام گرفت نیز کاهش معناداری در درصد FVC و FEV1 وFEV1/FVC در افراد غیرمتیله دیده شد(جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه بین گروه مواجهه یافته و کنترل از نظر سن و فاکتورهای اسپیرومتری در دو گروه متیله و غیر متیله

		متیلاسیون									P-value
		کل			غیرمتیله			متیله			
		تعداد	میانگین	انحراف معیار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	
سن	کنترل	۴۱	۴۱.۷۱	۹.۷۸	۸	۴۵.۱۳	۶.۲۰	۳۳	۴۰.۸۸	۱۰.۳۶	۰.۱۵۲
	مواجهه یافته	۹۱	۴۷.۶۶	۸.۲۵	۲۹	۴۶.۱۰	۷.۷۸	۶۲	۴۸.۳۹	۸.۴۲	۰.۲۲۱
FVC (%)	مواجهه یافته	۸۷	۵۹.۸۴	۱۵.۳۸	۲۹	۴۵.۳۳	۱۲.۳۰	۵۸	۶۷.۱۰	۱۱.۰۴	۰.۰۰۱>
FEV1(%)	مواجهه یافته	۸۷	۴۷.۶۴	۱۹.۴۸	۲۹	۳۰.۰۸	۱۵.۱۹	۵۸	۵۶.۴۲	۱۴.۹۶	۰.۰۰۱>
FEV1/FVC	مواجهه یافته	۸۶	۵۸.۶۷	۱۸.۰۲	۲۸	۴۸.۱۴	۱۵.۵۹	۵۸	۶۳.۷۶	۱۶.۹۹	۰.۰۰۱>
FEV1/FVC (%)	مواجهه یافته	۸۷	۷۴.۰۹	۲۰.۳۳	۲۹	۶۱.۲۵	۱۲.۰۴	۵۸	۸۰.۵۱	۲۰.۶۵	۰.۰۰۱>
FVC: forced vital capacity; FEV1: had first second of forced expiration											

براساس نوع بیماری مواجهه یافتگان به ۳ گروه افراد مبتلا به برونشیولیت آبلیترانس، برونشیت مزمن و آسم تقسیم بندی شدند. بیشترین تشخیص در بیماران به ترتیببرونشیت مزمن،برونشیولیت آبلیترانس و آسم بود.در میان افراد مبتلا به برونشیولیت آبلیترا نس و آسم تفاوت معنی داری بین سن گروه متیله و غیر متیله دیده نشد. در حالی که در مبتلایان به برونشیت مزمن میانگین سنی افراد دارای DNA متیله به نسبت افراد دارای DNA غیر متیله افزایش معنی داری را نشان داد. در همه‌ی گروه‌ها (برونشیولیت آبلیترانس، برونشیت مزمن و آسم) فاکتورهای اسپیرومتری در گروه غیرمتیله به صورت معنی‌داری پایینتر از گروه متیله بود (جدول ٤).

جدول ٤. مقایسه وضعیت متیلاسیون بین افراد مواجهه یافته بر اساس نوع بیماری

		متیلاسیون									P-value
		کل			غیرمتیله			متیله			
		تعداد	میانگین	انحراف معیار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	تعداد	میانگین	انحراف معیار	
سن	برونشیولیت آبلیترانس	۳۵	۴۷.۵۱	۸.۸۸	۱۳	۴۸.۹۲	۹.۷۱	۲۲	۴۶.۶۸	۸.۴۷	۰۴۷۹.
	برونشیت مزمن	۴۱	۴۶.۹۳	۷.۱۰	۱۲	۴۲.۷۵	۴.۳۳	۲۹	۴۸.۶۶	۷.۳۵	۰.۰۱۳
	آسم	۸	۵۱.۳۸	۹.۱۸	۳	۴۸.۶۷	۶.۵۱	۵	۵۳.۰۰	۱۰.۸۴	۰.۵۶۰
FVC (%)	برونشیولیت آبلیترانس	۳۵	۵۳.۳۸	۱۳.۶۷	۱۳	۴۷.۸۲	۱۲.۸۵	۲	۶۴.۶۲	۹.۹۲	۰.۰۰۱>
	برونشیت مزمن	۴۰	۶۰.۷۸	۱۶.۵۳	۱۲	۴۴.۲۵	۱۳.۲۱	۲۸	۶۷.۸۶	۱۲.۲۶	۰.۰۰۱>
	آسم	۸	۵۸.۷۵	۱۶.۴۳	۳	۴۲.۰۰	۷.۸۱	۵	۶۸.۸۰	۱۰.۲۶	۰.۰۰۸
FEV1(%)	برونشیولیت آبلیترانس	۳۵	۴۳.۷۵	۱۸.۳۲	۱۳	۲۷.۴۸	۷.۱۲	۲۲	۵۳.۳۷	۱۵.۹۳	۰.۰۰۱>
	برونشیت مزمن	۴۰	۴۸.۷۶	۱۸.۲۱	۱۲	۳۵.۵۸	۲۱۰۲۹	۲۸	۵۴.۴۱	۱۳.۵۶	۰.۰۰۲
	آسم	۸	۵۲.۵۰	۲۵.۰۹	۳	۲۳.۳۳	۸.۱۴	۵	۷۰.۰۰	۶.۸۹	۰.۰۰۱>
FEV1/FVC (Measured)	برونشیولیت آبلیترانس	۳۵	۵۶.۳۳	۱۴.۸۸	۱۳	۴۵.۵۸	۴.۵۲	۲۲	۶۰.۶۸	۱۵.۲۶	۰.۰۰۸
	برونشیت مزمن	۳۹	۶۰.۷۱	۱۷.۹۳	۱۱	۵۷.۰۰	۱۶.۹۲	۲۸	۶۲.۱۷	۱۸.۴۰	۰.۰۱۵
	آسم	۸	۵۷.۸۸	۱۹.۱۷	۱	۴۲.۶۷	۸.۳۹	۵	۶۷.۰۰	۱۸.۱۸	۰.۰۱۵
FEV1/FVC (%)	برونشیولیت آبلیترانس	۳۵	۶۸.۴۳	۱۸.۲۰	۱۳	۵۸.۰۹	۶.۶۳	۲۲	۷۴.۵۴	۲۰.۱۵	۰.۰۰۱>
	برونشیت مزمن	۴۰	۷۶.۳۹	۱۹.۵۰	۱۲	۶۵.۱۷	۱۶.۸۰	۲۸	۸۱.۲۰	۱۸.۸۲	۰.۴۲۵
	آسم	۸	۸۵.۳۸	۲۳.۵۴	۳	۶۲.۳۳	۳.۲۱	۵	۹۹.۲۰	۱۸.۱۰	۰.۰۴۳

بحث

تغییرات اپی‌ژنتیک متعددی در بیماری‌های التهابی ریه مانند COPD، آسم، IPF و حتی در مدل‌های حیوانی مواجهه یافته با سولفورموستارد نشان داده شده است که موجب فعال شدن مسیرهای مولکولی پیچیده التهابی مانند مسیر NFKB[1] و Jack-Stat می‌شوند(۲٤).متیلاسیون DNA یکی از مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک است که عمدتا در خاموش کردن ژن دخالت داشته و نقش کلیدی در حفظ تمایز سلولی ایفا می‌کند(۲۵).

در مطالعه حاضر افزایش وقوع متیلاسون در افراد مواجهه یافته با عوارض خفیف تا متوسط و کاهش آن در افراد مواجهه یافته با عوارض شدید به نسبت گروه کنترل مشاهده شد. همچنین با مقایسه سطح فاکتورهای اسپیرومتری که نشان دهنده عملکرد ریه می‌باشند، رابطه مستقیم بین افزایش سطح فاکتورهای اسپیرومتری و میزان وقوع متیلاسیون دیده شد.

اینترفرون گاما یک سایتوکاین پیش التهابی است که در ایمونوپاتوژنز بیماری‌های التهابی مزمن ریوی از جمله COPD و آسم نقش داشته و موجب التهاب از نوع پاسخ ایمنی سلولی(افزایش TH1,CTL)وتولید سیتوکین های التهابی و تخریب بافت ریه می‌شود(۱٤).افزایش ترشح IFN-γ در بیماران برونشیولیت آبلیترانس موجب افزایش تعداد و عملکرد ماکروفاژها و ترشح سایتوکین‌های پیش التهابی(TNF-α, IL6, IL1) و به‌دنبال آن تخریب آنزیم‌ها و تولید واسطه‌های فعال اکسیژن می‌شود(۲٦).

در بیماران مبتلا به COPD، التهاب با الگوی سایتوکین‌های مترشحه از لنفوسیت‌های T مرتبط است وتعداد لنفوسیت‌های ترشح کننده IFN-γ در ریه بیماران مبتلا به COPD افزایش می‌یابد. هم‌چنین سطوح ژن IFN-γ در مسیرهای هوایی و سیگنالینگ آن در ریه این بیماران افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که به منظور تعیین فنوتیپ لنفوسیت‌های T Helper در نمونه‌های ریه افراد سیگاری مبتلا به COPD متوسط تا شدید و آمفیزم و گروه کنترل انجام شد، آنالیز نتایج، افزایش تعداد لنفوسیت Th1 در مقایسه با افراد کنترل را نشان داده است. این لنفوسیت‌ها IFN-γ بیشتری ترشح کرده و CXCR3 بیشتری را بیان می‌کردند. این مطالعه ارتباط قوی بین افزایش TH1 و تخریب بافت ریه مرتبط با IFN-γ، MIG و IP10 را نشان داده است(۲۷).

مطالعات بسیاری اثر مواد شیمیایی را بر روی متیلاسیون نواحی پروموتوری ژن اینترفرون گاما در گروه‌های مختلف میتلا به آسم بررسی کردند و افزایش معنادار در سطوح متیلاسیون ژن IFN-γ در گروه بیمار به ویژه افراد با عوارض شدید را گزارش کردند. در برخی از این مطالعات هایپرمتیلاسیون این ژن به‌عنوان یک بیومارکر برای شناسایی آسم معرفی شده است (۲۱، ۲۸، ۲۹، ۲۲).

با در نظر گرفتن مطالب فوق، احتمالا الگوی بیان و متیلاسیون ژن IFN-γ در بین بیماران برونشیولیت آبلیترانس و COPD با آسم متفاوت است. نتایج کار حاضر نیز نشان می‌دهد که احتمالا الگوی متیلاسیون ژن IFN-γ در جانبازان شیمیایی با عوارض شدید ریوی مشابه بیمارانی با تشخیص برونشیولیت آبلیترانس و COPD می‌باشد.

اهمیت مطالعه حاضر از آن جهت است که هیپومتیلاسیون ژن IFN-γ و احتمالا افزایش بیان آن یکی از دلایل واکنش‌های التهابی و شدت بیماری ریوی مواجهه یافتگان باشد و در صورت تایید نتایج با روشهای کمی مانند بی‌سولفیت سکوئنسینگ و HRM و همچنین بررسی بیان ژن IFN-γ با روش کمی RT-PCR و ارتباط آن با سطوح متیلاسیون این ژن، از طرفی می‌تواند در انتخاب روند درمانی بیماران موثر باشد.

نتیجه گیری

در نتیجه احتمالا می‌توان اینگونه تخمین زد که افزایش متیلاسیون پروموتر این ژن می‌تواند تغییراتی در بیان آن اعمال کند که به روند عملکرد ریه در این بیماران کمک می‌کند.

[1]. Nuclear factor-kappa B

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد سپاس‌گزار هستند.

منابع

1. Balali M, Hefazi M. The pharmacology, toxicology and medical treatment of sulfur mustard poisoning. Fundamental & Clinical Pharmacology 2005;19:297–315
2. Balali-Mood M, Balali-Mood K, Danei G, Ghaeninejad E. Organophosphorous nerve agents poisoning. Journal of Birjand University *of* Medical Sciences 2006;13:5–24
3. Mansour Razavi S, Salamati P, Saghafinia M, Abdollahi M. A review on delayed toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2012 Oct 9;20(1):51
4. Dadpey M, Ghahari L. Respiratory complication of mustard gas in Iraq-Iran war victims living in Kermanshah. Journal of Army University of Medical Sciences of the I.R. Iran 2007;5:1331–1335.
5. Ghasemi Broumand M, Karamy G, Pourfarzam S, Emadi SN, Ghasemi H. Late concurrent ophthalmic, respiratory, cutaneous and psychiatric complications of chemical weapons exposure in 479 war patients. Daneshvar Medcine 2007;70:81–92
6. Bagheri MH, Hosseini SK, Mostafavi SH, Alavi SA. High-resolution CT in chronic pulmonary changes after mustard gas exposure. Acta Radiologica 2003;44:241–245
7. Ghanei M, Amiri S, Akbari H, Kosari F, HosseiniKhalili AR, Alaeddini F, Aslani J, Giardina C, Haines DD. Correlation of sulfur mustard exposure and tobacco use with expression (immune reactivity) of p53 protein in bronchial epithelium of Iranian mustard lung patints. MilMed Journal 2007;172:70–74.
8. Einollahi B, Jadidi K. A study of ophthalmic complications due the Mustard gas in the chemical war injured. Kowsar Medical Journal 2000;4:285–287.
9. Ghanei M, Harandi AA. Long term consequences from exposure to sulfur mustardreview. Inhalation Toxicology 2007;19:451–456
10. Alavian SM, Fallahian F, Shohrati M, Fakher-Yaseri H, Zamani F. Long term effects of mustard gas on Iranian veterans. Shiraz E-Medical Journal 2009;10:1–10.
11. Rosenbloom J, Feldman G, Freundlich B, Jimenez SA.Transcriptional control of human diploid fibroblast collagen synthesis by γ-interferon. Biochemical and Biophysical Research Communications 1984; 123: 365–372.
12. Hyde DM, Henderson TS, Giri SN, et al. Effect of murine-gamma interferon on the cellular responses to bleomycin in mice. Experimental Lung Research 1988; 14: 686–704.
13. Prior C, Haslam P. In vivo levels and in vitro production of interferon gamma in fibrosing interstitial lung diseases. Clinical and Experimental Immunology 1992; 88: 280–287
14. Rybka J, Korte SM, Czajkowska-Malinowska M, Wiese M, Kędziora-Kornatowska K, Kędziora J. The links between chronic obstructive pulmonary disease and comorbid depressive symptoms: role of IL-2 and IFN-γ. Clinical and Experimental Medicine 2016;16(4):493-502.
15. Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. Journal of Dental Research 2011;90(1):9-17.
16. Yang IV, Schwartz DA. Epigenetic control of gene expression in the lung. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2011;183(10):1295-301.
17. Yasmin R, Siraj S, Hassan A, Khan AR, Abbasi R, Ahmad N. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. Mediators of Inflammation 2015.
18. Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2014 15;189(10):1161-72.
19. Steinritz D, Schmidt A, Balszuweit F, Thiermann H, Simons T, Striepling E, et al. Epigenetic modulation in early endothelial cells and DNA hyper methylation in human skin after sulfurmustard exposure. Toxicology Letters 2016;244:95-102.
20. Imani S, Panahi Y, Salimian J, Fu J, Ghanei M. Epigenetic: A missing paradigm in cellular and molecular pathways of sulfur mustard lung: a prospective and comparative study. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2015;18(8):723.
21. Ouyang B, David I, Zana L. Interferon-γ promoter is hypermethylated in blood DNA from workers with confirmed Diisocyanateasmthma. Toxicological Sciences 2013; 133(2): 218–224.
22. Kohli A. Secondhand smoke in combination with ambient air pollution exposure is

associated with increased CpG methylation and decreased expression of IFN-γ in T effector cells and Foxp3 in T regulatory cells in children. Clinical Epigenetics 2012,4:17.

23. Ouyang B, Baxter CS, Lam H-M, Yeramaneni S, Levin L, Haynes E, et al. Hypomethylation of dual specificity phosphatase 22 promoter correlates with duration of service in firefighters and is inducible by low-dose benzo] a] pyrene. Journal of Occupational and Environmental Medicine 2012;54(7):774.
24. Imani S, Panahi Y, Salimian J, Fu J, Ghanei M. Epigenetic: A missing paradigm in cellular and molecular pathways of sulfur mustard lung: a prospective and comparative study. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2015;18(8):723.
25. Durham AL, Adcock IM. Basic science: Epigenetic programming and the respiratory system. Breathe 2013;9(4):278-88.
26. Lu KC, Jaramillo A, Lecha RL, Schuessler RB, Aloush A, Trulock EP, Mendeloff EN, Huddleston CB, Patterson GA, Mohanakumar T. Interleukin-6 and interferon-γ gene polymorphisms in the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation1. Transplantation 2002;74(9):1297-302.
27. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. PLoS Medicine 2004;1(1):e8
28. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. Science 2002 295(5557):1079–8210.
29. Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. Journal of Biological Chemistry 2011;286(21):18347-53.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
27th Year, No.144
December 2019-January 2020

Received: 28/09/2019
Last revised: 11/12/2019
Accepted: 22/12/2019

Daneshvar(medicine) shahed University/ 27th year/2019-2020 /NO.144

Methylation of IFN-γ in sulfur mustard-exposed patients

Ashraf Vafa[1,2], Soghrat Faghihzadeh[2], Sarah Ghafarpour[3], Hossein Behboodi[4], Mohammad Saber Zamani[5], Tooba Ghazanfari[1,3]

1. Department of Immunology, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Department of Biostatistics and Social Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Islamic Republic of Iran.
3. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
4. Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Islamic Republic of Iran
5. Department of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail:** tghazanfari@yahoo.com.

Abstract

Introduction: IFN-γ is one of the most important cytokines in the development of chronic inflammatory diseases such as asthma and COPD. The IFN-γ promoter methylation at CpG islands could be altered by various chemical and toxic substances which may have a role in the incidence of chronic pulmonary diseases and its severity. Thereby, the present study was aimed to evaluate the effect of sulfur mustard gas on the methylation status of IFN-γ gene promoter and its correlation with the severity of pulmonary disease in chemical veterans with delayed pulmonary complications.

Methods: 46 sulfur mustard-exposed individuals with mild-moderate pulmonary complications, 45 with severe pulmonary complicationsand 41 unexposed individuals as a control group participated. The quality and quantity of extracted DNA were assessed by the nanodrop machine. After treatment with bisulfite, the methylation of IFN-γ gene promoter was evaluated by methylation-specific PCR .

Results: The methylation of IFN-γ gene promoter showed a significant increase in exposed-patients with mild to moderate pulmonary complications and a significant reduction in exposed-patients with severe pulmonary complications compared to the control groups. The levels of spirometric parameters were significantly higher in individuals with Methylated DNA compared with those with unmethylated DNA.

Conclusion: It could be suggested that hyper-methylation of IFN-γ gene promoter and probable changes in IFN-γ gene expressionhave a positive effect on lung function in SM-exposed individuals.

Keywords: Methylation, IFN-γ, Sulfur mustard, Pulmonary complications