جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ٤: از ۱۱-۱۸
زمستان ۱۳۸۸

بررسی رونوشت‌های HLA-G در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد سالم و دچار لوپوس و اثر اینترفرون گاما بر مولکول HLA-G

محمد انصاری[۱]، احمد زواران‌حسینی[۲*]، فاطمه یاری[۳]

۱- کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۸/۰۶ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۵

چکیده

هدف: این مطالعه بررسی اثر اینترفرون گاما بر بیان رونوشت‌های HLA-G در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد سالم و مبتلا به بیماری خودایمن لوپوس اریتروماتوز سیستمیک است.

مواد و روش‌ها: ۲۰ نمونه خون از افراد دچار بیماری لوپوس اریتروماتوز سیستمیک و ۱۵ نمونه از افراد سالم انتخاب شده و سپس با روش فایکول لایه مربوط به PBMC جداسازی شد. سلول‌های به‌دست آمده در مجاورت اینترفرون گاما به‌مدت ٤۸ ساعت کشت داده شده؛ سپس توسط روش ترایزول، استخراج RNA ازآن سلول‌ها و سپس تبدیل RNA به cDNA و انجام PCR چندگانه با به‌کارگیری همزمان آغازگرهای بتا- اکتین و HLA-G انجام شد. در نهایت محصول حاصل الکتروفورز ارزیابی شد.

نتایج: این مطالعه نشان داد که میزان نسبی رونویسی ژن HLA-G در افراد مبتلا به لوپوس نسبت به افراد طبیعی بالاتر است. از طرف دیگر افزودن اینترفرون گاما/لیپوپلی‌ساکارید روی بیان این مولکول در سطح رونویسی تأثیر می‌گذارد؛ به‌گونه‌ای که رونویسی ژن HLA-G در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد سالم و بیمار افزایش می‌یابد ($P\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: رونویسی ژن HLA-G تحت تأثیر اینترفرون گاما افزایش می‌یابد. این مشاهده با مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد. این اثر بر سلول‌های PBMCs طبیعی و بیمار دیده می‌شود. تأثیر اینترفرون گاما/لیپوپلی‌ساکارید در القای رونویسی ژن HLA-G در PBMCs افراد طبیعی بیش از بیمار است؛ با این حال میزان کلی رونویسی در سلول‌های بیمار دچار لوپوس اریتروماتوز سیستمیک بیش از طبیعی است.

کلیدواژگان: HLA-G، بیماری لوپوس اریتروماتوز سیستمیک، اینترفرون گاما

۱- مقدمه

HLA-G (Human Leucocyte Antigen-G) یکی از مولکول‌های غیرکلاسیک HLA-I است که حدود ۲۰ سال پیش بروز آن توسط سلول‌های تروفوبلاست جفتی مشخص شد. از آن‌جایی که سلول‌های تروفوبلاست مرز بین مادر و جنین را تشکیل می‌دهند، بنابراین تصور می‌شود HLA-G نقش مهمی در حفاظت از جنین در قبال سیستم ایمنی مادر دارد. ژن HLA-G روی کروموزوم شماره شش در کمپلکس سازگاری نسجی (Major Histocompatibility Complex: MHC)

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی،گروه ایمونولوژی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: zavarana@modares.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

واقع است و برخلاف ژن‌های کلاسیک MHC-I تنوع ژنتیکی پایینی دارد و با تغییر حدود ۲۰ نوکلئوتید، کمتر از ۱۰ پروتئین مختلف تولید می‌کند [۱]. ژن HLA-G با پردازش متناوب mRNA هفت پروتئین مختلف ایجاد می‌کند. این پروتئین‌ها شامل چهار پروتئین متصل به غشا (HLA-G1 تا HLA-G4) و سه پروتئین محلول (HLA-G5 تا HLA-G7) است. فرم کامل mRNAی HLA-G باعث تولید پروتئین HLA-G1 می‌شود. این پروتئین شامل سه دومن (Domain) کروی خارج سلولی، یک دومن متصل به غشا و یک دومن داخل سیتوپلاسمی است. با حذف اگزون ۳ و (یا) اگزون ٤ از mRNAی اولیه ایزوفرم‌های ۲، ۳ و ٤ از HLA-G ایجاد می‌شوند و با دخول اینترون ۲ یا ٤، ایزوفرم‌های محلول شامل HLA-G5 (فرم کامل و محلول) و HLA-G6 (فرم محلول و مشابه به HLA-G2) و HLA-G7 (فرم محلول و مشابه به HLA-G3) تولید می‌شود [۱-۳]. در واقع در اینترون ٤ حضور یک کدون پایان باعث می‌شود دومن‌های سیتوپلاسمی و بین غشایی HLA-G تشکیل نشوند و در نهایت اشکال محلول ایجاد شود [٤]. ساختار فرم متصل به غشا (HLA-G1) و محلول (HLA-G5) مشابه است و هر دو مشابه پروتئین‌های کلاس یک کلاسیک دارای سه دومن خارج سلولی و متصل به β2 میکروگلوبین هستند [٥].

بررسی‌ها نشان داده‌اند فرم متصل به غشا و فرم محلول هر دو، عملکرد سیتولیتیک سلول کشنده طبیعی (Natural Killer cell: NK cell) و سلول‌های T (T cell: TC) را مهار می‌کنند [٥-۷]. علاوه بر این، فرم محلول HLA-G قادر است که در سلول $TCD8^+$ و NK، مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) را القا کند [۷].

لوپوس (Lupus) یک بیماری خودایمنی است که درآن اعضای بافت‌ها و سلول‌ها به‌واسطه حضور اتوآنتی‌بادی‌ها و کمپلکس‌های ایمنی متصل‌شونده به بافت، آسیب می‌بینند [۸]. ۹۰ درصد بیماران را زنان در سنین باروری تشکیل می‌دهند. این بیماری به‌صورت مزمن بروز نموده و در صورتی که ارگان‌های اصلی بدن را تحت تأثیر قرار دهد تهدیدکننده جان بیمار است ولی بیشتر به‌صورت بیماری ناتوان‌کننده مزمن عمل می‌کند. عواملی مانند نور خورشید و داروها می‌توانند سبب بروز بیماری شوند ولی هیچ‌کدام به‌عنوان عامل آغاز بیماری شناسایی نشده‌اند [۸]. همچنین رابطه‌ای بسیار قوی بین ژن‌های HLA خاص به‌ویژه اسیدهای آمینه و سکانس‌های اسیدآمینه‌ای در نواحی α، β، DQ، DR و توانایی تولید اتوآنتی‌بادی‌ها در این بیماری وجود دارد [۹]. اینترفرون گاما (Interferon gamma: IFN-γ)، سیتوکین (Cytokine) اصلی فعال‌کننده ماکروفاژ است و نقش‌های بسیار مهمی در ایمنی ذاتی و ایمنی وابسته به سلول اکتسابی بر ضد میکروب‌های داخل سلول ایفا می‌کند و عملکرد اصلی‌اش به‌عنوان فعال‌کننده سلول‌های عمل‌گر سیستم ایمنی است [۱۰].

هدف این مطالعه بررسی تأثیر بیان IFN-γ در ارتباط با رونویسی ژن HLA-G است تا به این طریق بتوان با افزایش بیان این مولکول، بیماری را کنترل نمود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌ها

از بین بیماران مبتلا به بیماری لوپوس مراجعه‌کننده به مرکز روماتیسم ایران به‌طور تصادفی ۲۰ نمونه خون و همچنین ۱۵ نمونه خون سالم از اهداکنندگان مغز استخوان در سازمان انتقال خون ایران به‌عنوان جمعیت کنترل جمع‌آوری شد.

۲-۲- جداسازی سلول‌ها

خون محیطی در لوله‌های استریل حاوی هپارین جمع‌آوری شد. جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بعد از جمع‌آوری توسط فایکول هایپک (Ficoll-hypac) (تولید سازمان انتقال خون ایران) انجام شد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲-۳- انتقال سلول‌های لکوسیت به محیط کشت سلولی

ابتدا در پلیت‌های کشت ۲٤ خانه‌ای به مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 شامل: پنی‌سیلین (Penicillin) ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر، استرپتومایسین (Streptomycin) ۰/۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، ال- گلوتامین ۲ میلی‌مولار، FCS (Fetal Calf Serum) ۵ درصد در هر چاهک ریخته شده سپس ۱ میلی‌لیتر از سلول‌های یکنواخت شده به هر چاهک افزوده شد. پس از آن، مقدار ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر از IFN-γ (Behringer، آلمان) و ۱۰ نانوگرم لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide: LPS) به ازای هر ۱ سی‌سی سوسپانسیون سلول در چاهک‌های مربوط اضافه شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ٤۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت سلولی انکوبه شد. لازم به ذکر است که برای هر نمونه یک چاهک به‌عنوان کنترل (بدون اینترفرون و LPS) در نظر گرفته شد.

۲-٤- کشت رده سلولی JEG-3

رده سلولی کوریوکارسینومایی (Choriocarcinoma) JEG-3، بیان‌کننده HLA-G است. این رده سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و سپس در محیط کشت RPMI-1640 مشابه با محیط شرح داده شده در قسمت ۲-۳- کشت داده شد. سلول‌های JEG-3 که سطح فلاسک را پر کرده بود، به‌وسیله محلول شامل تریپسین- EDTA (Trypsin- EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid) در غلظت ۰/۰۵ درصد (وزن/حجم) از تریپسین و ۰/۰۲ درصد (وزن/حجم) از EDTA. از سطح فلاسک جدا شد. سلول‌های به‌دست آمده در محلول حاوی DMSO (Dimethyl sulfoxide) (۱۰درصد) و FCS (۹۰درصد) منجمد شده و یا برای پاساژ و کشت مجدد استفاده شد. سلول‌های حاصل از کشت مجدد با محلول تریپسین- EDTA از سطح فلاسک جدا شده و در میکروتیوب‌ها در تعداد $۵×۱۰^{٦}$ سلول در میلی‌لیتر تقسیم و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۵- استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل از تعداد $۱-۲×۱۰^{٦}$ لنفوسیت در هر چاهک با استفاده از روش ترایزول (Trizol) (Invitrogen) جدا شد. این روش بر مبنای به‌کارگیری گوانیدیوم ایزوتیوسیانات (Guanidium thiocyanate) عمل می‌کند. سپس بعد از قرار دادن RNA در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه اقدام به سنتز cDNA از ۵ میکرولیتر RNA با غلظت ۱ میکروگرم در میکرولیتر در مخلوط شامل ۵ میکرولیتر بافر ۵X، ۱ میکرولیتر از dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر آغازگرهای (Primers) اختصاصی (۲۰ میکرومولار)، ۱ میکرولیتر RNasin (٤۰ واحد در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آنزیم MMLV (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) و ۱۱ میکرولیتر آب DEPC (Diethylpyrocarbonate) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شد.

۲-٦- تکثیر به روش PCR چندگانه (Multiplex PCR)

cDNA به‌دست آمده به‌عنوان DNA الگو در مخلوطی شامل ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر جفت آغازگر با غلظت ۲۰ پیکومول در میکرولیتر، ۲/۸ میکرولیتر بافر۹X، ۰/۱۰ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۸ میکرولیتر مخلوط dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۰/٤ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز *Taq* (*Taq* DNA Polymerase)، ۵ واحد در میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه شد و PCR چندگانه با به‌کارگیری جفت آغازگرهای بتا- اکتین و HLA-G انجام و سپس محصول توسط روش الکتروفورز روی ژل بررسی شد.

آغازگرهای زیر طراحی و توسط شرکت MWG آلمان تولید و در مطالعه استفاده شد.

۱- جفت آغازگر مربوط به بتا- اکتین برای کنترل داخلی:

5'-TCG TCG TCG ACA ACG GCT CC-3'
5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GA-3'

۲- جفت آغازگرهای مربوط به HLA-G:

5'-GGAAGAGGAGACACGGAA CA-3'
5'-GGCTGGTCTCTGCACAAA GAG A-3'

۲-۷- روش‌های آماری

در این مطالعه برای بررسی آماری داده‌های حاصل از نرم‌افزار UVI PRO، از نرم‌افزار SPSS و روش آنالیز مقایسه میانگین‌ها (Paired T- test) با سطح معنی‌داری P≤۰/۰۵ استفاده شد.

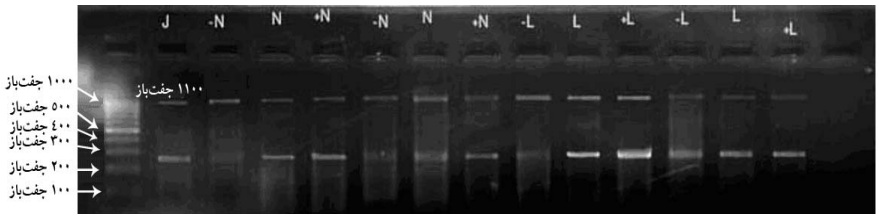
۳- نتایج

در این مطالعه با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی HLA-G اقدام به مقایسه رونویسی این ژن در دو جمعیت طبیعی و بیمار شد. به‌طور همزمان رونوشتی از ژن بتا-اکتین نیز تکثیر شد تا امکان نیمه‌کمّی کردن نتایج در دو گروه وجود داشته باشد.

سلول‌های لکوسیت به‌دست آمده از افراد طبیعی و بیمار در محیط کشت، به‌طور همزمان تحت تأثیر IFN-γ به‌تنهایی یا همراه با LPS قرار گرفته و تأثیر این عوامل در رونویسی ژن HLA-G ارزیابی شد.

نتایج به‌دست آمده نشان داد در میان رونوشت‌های مختلف HLA-G، اغلب تنها یک رونوشت در سلول‌های JEG-3 و در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی قابل ردیابی بوده که با توجه به وزن مولکولی آن، رونوشت یکی از اشکال غشایی به‌نام HLA-G3 است.

همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود در نمونه‌های طبیعی قبل از مواجهه با IFN-γ، بیان HLA-G کم بوده یا هرگز ملاحظه نمی‌شود.



شکل ۱ نمونه‌ای از انجام PCR چندگانه با به‌کارگیری آغازگرهای بتا- اکتین و HLA-G برای دو نمونه طبیعی و دو نمونه لوپوس پس از انجام الکتروفورز؛ در این شکل **M**) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی DNA Ladder، **J**) نشانگر JEG-3، **N-**) نشانگر نمونه طبیعی بدون درمان، **N**) نشانگر نمونه طبیعی با تأثیر IFN-γ، **N+**) نشانگر نمونه طبیعی با تأثیر همزمان IFN-γ و LPS است و به‌همین ترتیب افراد دچار لوپوس با حرف L نشان داده شده‌اند. (برای ساخت cDNA از آغازگرهای اختصاصی بتا- اکتین و HLA-G استفاده شده است).

برای آنالیز نمونه‌ها ابتدا عکس‌های گرفته شده توسط دستگاه ژل‌داک (Gel doc) توسط نرم‌افزار UVI PRO برای به‌دست آوردن وزن مولکولی و MI (Maximal intensity) استفاده شد. این نرم‌افزار یک نرم‌افزار برای آنالیز ژل است. سپس نسبت MI برای HLA-G به MI بتا- اکتین (کنترل داخلی) سنجیده شد. در نهایت طبقه‌بندی اطلاعات و آنالیز نتایج توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد (جدول ۱). با به‌کارگیری نرم‌افزار UVI PRO برای به‌دست آوردن وزن‌های مولکولی، مشخص شد که میانگین وزن مولکولی باند به‌دست آمده برای بتا- اکتین ۱۱۰۰ جفت‌باز و برای HLA-G، ۲۶۰ جفت‌باز است.

جدول ۱ مقایسه مقادیر میانگین نسبت MI (چگالی باند) HLA-G به بتا- اکتین در نمونه‌های طبیعی و لوپوس

وضعیت نمونه‌های مورد مطالعه	میانگین نسبت HLA-G MI به بتا- اکتین	انحراف معیار
لوپوس بدون درمان	۱/۱۹	۰/۳۸
لوپوس + IFN	۱/۳۶	۰/۵۳
لوپوس + IFN + LPS	۱/۵۱	۰/۵۷
طبیعی بدون درمان	۰/۵۷	۰/۳۵
طبیعی + IFN	۱/۰۹	۰/۶۱
طبیعی + IFN + LPS	۱/۳۸	۰/۵۰

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده می‌شود اولاً میانگین بیان HLA-G در افراد دچار لوپوس بالاتر از افراد طبیعی بوده و ثانیاً با تأثیر IFN-γ این بیان بیشتر می‌شود و همچنین LPS به این بیان کمک می‌نماید و به‌عنوان کنترل مثبت است.

با در نظر گرفتن P≤۰/۰۵، نتایج زیر حاصل می‌شوند:

۱- بین بیان HLA-G در افراد دچار لوپوس و افراد طبیعی قبل از تأثیر IFN-γ رابطه وجود دارد و بیان آن در افراد دچار لوپوس بالاتر از افراد طبیعی است.

۲- IFN-γ روی سلول‌های افراد طبیعی تأثیر داشته و باعث افزایش بیان HLA-G در این سلول‌ها شده است.

۳- IFNγ روی سلول‌های افراد دچار لوپوس تأثیر قابل توجهی نداشته ولی به هر حال میانگین بیان HLA-G بالاتر از افراد طبیعی است.

٤- بحث

HLA-G یکی از مولکول‌های غیرکلاسیک HLA-I است که حدود ۲۰ سال پیش بروز آن توسط سلول‌های تروفوبلاست جفتی مشخص شد. از آن‌جایی که سلول‌های تروفوبلاست مرز بین مادر و جنین را تشکیل می‌دهند، بنابراین تصور می‌شود که این مولکول نقش مهمی در حفاظت از جنین در قبال سیستم ایمنی مادر داشته باشد [۱]. الگوی بیان انتخابی رونوشت‌های HLA-G در بافت‌ها نمایانگر این است که در بیان ژن کنترل حساب شده‌ای در سطح رونویسی موجود است[۱].

با مطالعات اولیه روی HLA-G در دوران بارداری و نقش حفاظتی آن، بیان این مولکول در بیماری‌های التهابی و بدخیم و پیوند کلیه، کبد و قلب و سرطان مورد توجه قرار گرفت. به دلیل گزارش‌های قبلی مبنی بر تنظیم تعادل سیتوکینی Th1/Th2 و غلبه نسبی Th2 توسط HLA-G، نقش تنظیمی برای این مولکول پیشنهاد شده است [۱۱].

لوپوس یک بیماری خودایمن است که درآن اعضای بافت‌ها و سلول‌ها به‌واسطه حضور اتوآنتی‌بادی‌ها و کمپلکس‌های ایمنی متصل‌شونده به بافت، آسیب می‌بینند [۹]. از طرفی رابطه بیماری لوپوس اریتروماتوز سیستمیک (Systemic Lupus Erythematosus: SLE) با سیتوکین‌ها مشخص شده است که بر مبنای این مطالعات، TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha) می‌تواند نقش محافظتی در افراد دچار SLE داشته باشد و برخلاف آن اینترلوکین ۱۰ (Interleukin 10: IL-10) پاسخ خودایمن را با تولید اتوآنتی‌بادی‌ها و فعال شدن بیماری تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۰].

همچنین مشخص شده است که افراد دچار نفریت لوپوسی نسبت به افراد لوپوسی IL-18 بیشتری را همراه با تولید بیشتر IFN-γ بیان نموده و IL-4 کمتری تولید می‌نمایند. بنابراین IL-18 شاخص جدیدی در شناسایی نفریت لوپوسی (Lupus nephritis) است [۱۱].

سیتوکین‌های سیستم ایمنی ذاتی مانند TNF و IFN نوع I (α و β) نقش کلیدی در خودایمنی دارند. IFN-α و IFN-β احتمالاً سبب بسیاری از تغییرات ایمونولوژیک در افراد دچار SLE می‌شوند [۱۲].

نتایج به‌دست آمده توسط محققین مختلف نشان می‌دهد که IFN-γ باعث افزایش میزان HLA-G mRNA در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی می‌شود. مکانیسم این افزایش بیان ناشناخته است. به‌نظر می‌رسد که احتمالاً IFN-γ باعث افزایش میزان رونویسی ژن HLA-G می‌شود و IFN-γ به‌وسیله سلول‌های تروفوبلاست سنتز می‌شود که اوج این سنتز در اوایل دوران بارداری است؛ در این دوران است که mRNA HLA-G به‌صورت بارزی در سلول‌های پایه پرزی جفت حضور دارد. بنابراین احتمال وجود رابطه بین IFN-γ و HLA-G در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد [۱۳].

از طرفی در برخی بیماری‌های التهابی و خودایمن بیان و نقش HLA-G مشخص شده است؛ از جمله رزادو (Rosado) و همکاران (۲۰۰۸) بیان HLA-G را در بیماری لوپوس نشان دادند. این محققین ارتباط بین بیان HLA-G در افراد دچار لوپوس و تولید IL-10 را بررسی نمودند و دریافتند که افراد

دچار لوپوس در مقایسه با افراد گروه کنترل میزان بیشتری HLA-G محلول و IL-10 تولید می‌کنند و نتیجه گرفتند که با وجود بیان بیشتر این مولکول نسبت به افراد گروه کنترل به‌نظر می‌رسد که هیچ ارتباطی بین بیان HLA-G و تولید IL-10 یا فعالیت بیماری وجود ندارد [١٤].

در مطالعه دیگری که برای مقایسه بیان HLA-G در افراد دچار بیماری لوسمی لنفوسیتیک مزمن (Chronic Lymphocytic Leukemia: CLL) و افراد سالم توسط انستیتو پاستور ایران انجام شد، بیان این مولکول در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) مشاهده نشد [١٥].

از طرفی در مطالعات دیگر نشان داده شده که در افراد دچار لوپوس، افزایش بیان STAT-1 (Single Transducers and Activators of Transcription) در PBMCs به‌طور مشخص با فعالیت بیماری در ارتباط است [١٦]. به‌علاوه؛ بیان ژن‌های محرک دیگر IFN-γ مانند IP-10 (Inducible Protein-10) یا Mig نیز در مونوسیت‌های این افراد بالاتر است. در حالی‌که فسفوریلاسیون STAT-1 در PBMCs افراد دچار SLE و افراد سالم بعد از تحریک IFN-α مشابه است ولی در اثر IFN-γ فسفوریلاسیون STAT-1 تنها در لنفوسیت‌های افراد بیمار رخ می‌دهد. نشان داده شده است که افزایش پاسخ‌دهی مونوسیت‌های افراد دچار SLE به IFN-γ در سطح mRNA نیز صورت می‌گیرد با این وجود بیان گیرنده IFN-γ در لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌های افراد سالم و بیمار مشابه است. در مجموع این اطلاعات نشان می‌دهند که IFNها به‌طور کلی در آسیب‌زایی یا ایمونوپاتوژنز افراد دچار SLE نقش داشته و نقش IFN-γ را در این بیماری تأیید می‌کند [١٧].

علت انتخاب IFN-γ در این مطالعه با توجه به تحقیقات پاسکوال (Pascual) و همکاران در سال ٢٠٠٦ است؛ در این مطالعه اشاره شده که اگر چه IFN-α و IFN-β نیز بیان HLA-G را افزایش می‌دهند اما به نسبت کمتری در مقایسه با IFN-γ عمل می‌کنند [١٨]. در این مطالعه اثر IFN-γ بر بیان رونوشت‌های HLA-G در بیماران مبتلا به لوپوس بررسی شد. علت بررسی IFN-γ این بود که این سیتوکین از نظر پروفایل به Th1 تعلق دارد و فعالیت این پروفایل در بیماران لوپوسی باعث کاهش التهاب و کنترل عوارض جانبی بیماری می‌شود. بنابراین اگر بتوان به‌نحوی HLA-G را از طریق تقویت تولید و فعالیت IFN-γ افزایش داد، نه‌تنها عوارض جانبی بلکه خود بیماری را نیز می‌توان کنترل کرد و مطالعه حاضر با این فرض انجام شد. ابتدا بایستی دوز مناسب IFN-γ بر بیان تعیین می‌شد که براساس مطالعات یانگ (Yang) و همکاران در سال ١٩٩٦ مشخص شد که دوز ١٠٠ واحد در میلی‌لیتر از IFN-γ بهترین دوز مؤثر بر بیان است [١٩]؛ بنابراین از این دوز برای مطالعه حاضر استفاده شد.

از طرفی لازم بود که از یک سلول بیان‌کننده HLA-G به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شود که از سلول JEG-3 که یک رده سلولی کوریوکارسینومایی (Choriocarcinoma) با منشاء انسانی است پس از کشت، همراه با نمونه‌ها استفاده شد. ضمناً از بتا- اکتین برای نیمه‌کمّی کردن PCR استفاده شد. یاری (Yari) و همکاران قبلاً از این روش برای مطالعه ارتباط HLA-G و بیماری پمفیگوس (Pemphigus) استفاده کرده بودند. بتا- اکتین در واقع یک کنترل داخلی برای بیان سلول‌ها است [٢٠].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان HLA-G در افراد دچار لوپوس و افراد طبیعی بدون تأثیر IFN-γ متفاوت بوده و بیان آن در افراد دچار لوپوس بالاتر از افراد طبیعی است که این یافته با مطالعات رزادو و همکاران مطابقت دارد [١٤]. همچنین بررسی حاضر نشان داد که IFN-γ روی سلول‌های افراد طبیعی نیز تأثیر داشته و باعث افزایش بیان HLA-G در این سلول‌ها می‌شود که این یافته نیز با مطالعات یانگ و همکاران مطابقت دارد [١٩]. علاوه بر این نشان داده شد که IFN-γ روی سلول‌های افراد دچار لوپوس تأثیر قابل توجهی ندارد، اما میانگین رونویسی HLA-G بالاتر از افراد طبیعی است. لازم به ذکر است که رونوشتی از HLA-G که در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در مطالعه حاضر مشاهده شد و

مبنای مقایسه قرار گرفت، یکی از اشکال غشایی HLA-G است که در این مطالعه فرم G3 است.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیان HLA-G در بیماران بدون اثر IFN-γ بالاتر از افراد طبیعی است و بعد از تأثیر این سیتوکین، بیان HLA-G در افراد طبیعی بالا می‌رود ولی روی افراد دچار بیماری تأثیر قابل توجهی ندارد (P≤۰/۰۵). با این حال همچنان بیان این مولکول در افراد بیمار بالاتر از افراد طبیعی است. در نتیجه با توجه به نقش IFN-γ روی افراد دچار لوپوس که سبب افزایش فسفوریلاسیون STAT-1 و فعال نمودن بیماری می‌شود پیش‌بینی می‌شود که سیتوکین IFN-γ قادر به بهبود مؤثر بیماری نخواهد بود.

۵- تشکر و قدردانی

از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل اختصاص بودجه و سازمان انتقال خون به دلیل همکاری علمی در راستای اجرای پروژه و همچنین مرکز روماتیسم ایران به دلیل در اختیار گذاشتن نمونه‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. Adv Immunol 2003; 81: 199–252.

[2] Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. Immunol Today 1999; 20(2): 60–2.

[3] Ishitani A, Geraghty DE. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(9): 3947–51.

[4] Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. J Immunol 1994. 153(12): 5516–24.

[5] Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. J Reprod Immunol 2000; 48(1): 17–26.

[6] Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. SSoluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(21):12150–5.

[7] LeMaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(18): 7064–9.

[8] Salmon M, Gordon C. The role of apoptosis in systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 1999; 38(12): 1177-83.

[9] Nossent JC. Systemic lupus erythematosus on the Caribbean island of Curaçao: an epidemiological investigation. Ann Rheum Dis 1992; 51(11): 1197-201.

[10] Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol 1997; 15: 749-95.

[11] Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, Stignani M, Carturan S, Grappa MT, Fotinidi M, Ferretti S, Voss A, Laustrup H, Junker P, Trotta F, Baricordi OR.

[15] Rezvany MR, Kazemi A, Hajifathali A, Kaviani S, Mellstedt H. Analysis of HLA-G gene expression in B-lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. Iran Biomed J 2007; 11(2): 125-9.

[16] Karrar A, Sequeira W, Block JA. Coronary artery disease in systemic lupus erythematosus: A review of the literature. Semin Arthritis Rheum 2001; 30(6): 436-43.

[17] Sultan SM, Ioannou Y, Isenberg DA. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 1999; 38(10): 917-32.

[18] Pascual V, Palucka K, Banchereau J. Role of innate immunity cytokines in systemic lupus and systemic onset arthritis International Congress Series 2005; 1285: 50-4.

[19] Yang Y, Chu W, Geraghty DE, Hunt JS. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. J Immunol 1996; 156(11): 4224-31.

[20] Yari F, Zavaran Hosseini A, Nemat Gorgani M, Khorramizadeh MR, Mansouri P, Kazemnejad A. Expression of HLA-G in the skin of patients with pemphigus vulgaris. Iran J Allergy Asthma Immunol 2008; 7(1): 7-12.

HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 2008; 71(6): 520-9.

[12] Karonitsch T, Feierl E, Steiner CW, Dalwigk K, Korb A, Binder N, Rapp A, Steiner G, Scheinecker C, Smolen J, Aringer M. Activation of the interferon-gamma signaling pathway in systemic lupus erythematosus peripheral blood mononuclear cells. Arthritis Rheum 2009; 60(5): 1463-71.

[13] Lefebvre S, Berrih-Aknin S, Adrian F, Moreau P, Poea S, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. J Biol Chem 2001; 276(9): 6133-9.

[14] Rosado S, Perez-Chacon G, Mellor-Pita S, Sanchez-Vegazo I, Bellas-Menendez C, Citores MJ, Losada-Fernandez I, Martin-Donaire T, Rebolleda N, Perez-Aciego P. Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. Hum Immunol 2008; 69(1): 9-15.