مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره نهم، شماره سی و چهار - بهار ۱۳۹۸

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی ارتباط واریانت ژنتیکی rs1801275 گیرنده IL-4 در بیماران مبتلا به مالتیپلاسکلروزیس در شهر اصفهان

مریم آزادی[۵، ۱]، فرشته آل صاحب فصول [۲،۵*]، رسول صالحی[۳]، الهه تاجبخش[۱]، مسعود اعتمادی فر[۵، ۶]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۳. گروه بیولوژی مولکولی و ژنتیک دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۴. مرکز تحقیقات MS و نورولوژی اصفهان
۵. گروه داخلی اعصاب دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020

چکیده

سابقه و هدف: بیماری MS یک بیماری التهابی و مزمن سیستم اعصاب مرکزی است. مطالعه حاضر واریانت ژنتیکی rs1801275 ژن گیرنده اینترلوکین ۴ را در بیماران مبتلا به RRMS مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نفر بیمار RRMS و ۱۰۰ نفر سالم به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شدند سپس استخراج DNA انجام شد و پلی‌مورفیسم rs1801275 گیرنده اینترلوکین ۴ با روش Real Time PCR HRM مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: گروه شاهد ۴۵٪ دارای ژنوتیپ طبیعی (AA)،۴۰٪ هتروزیگوت (AG) و ۱۵٪ دارای ژنوتیپ هموزیگوت (GG) بودند و گروه بیمار ۲۰٪ دارای ژنوتیپ طبیعی (AA) ، ۵۸٪ هتروزیگوت(AG) و ۲۲٪ هموزیگوت (GG) بودند.

بحث: نتایج پژوهش نشان داد که فراوانی آلل G پلی‌مورفیسم rs1801275 ژن گیرنده اینترلوکین ۴ در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد به‌صورت معناداری افزایش پیدا کرده است (P-Value=۰/۰۲۲) .

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم rs۱۸۰۱۲۷۵ ژن گیرنده اینترلوکین ۴ می‌تواند در افزایش احتمال ابتلا به بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: مالتیپل‌اسکلروزیس، واریانت ژنتیکی، rs1801275، گیرنده اینترلوکین ۴.

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (MS)[1] یک بیماری التهابی و مزمن سیستم اعصاب مرکزی است که باعث التهاب و تخریب اولیه و ثانویه پایانه‌های عصبی مثل آکسون‌ها و میلین‌ها می‌شود (۵). بیش‌ترین میزان شیوع آن در بالغین ۲۰ تا ۴۰ ساله بالا بوده و زنان ۳-۲ برابر بیش‌تر از مردان درگیر می‌شوند (۲۰). یکی از مشکل‌های بیماری MS غیر قابل پیش‌بینی بودن میزان پیشرفت بیماری است به‌طوری‌که در برخی از بیماران سیر

نویسنده مسئول:
گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
پست الکترونیکی: alsahebfosoul@med.mui.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۴

[1] - Multiple Sclerosis

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020

بیماری سریع است ولی در برخی دیگر سیر بیماری کند و تدریجی است. عقیده بر این است که در اکثریت بیماران، سیر بیماری رابطه مستقیمی با فعالیت واکنش‌های سیستم ایمنی علیه میلین‌ها یا سایر پایانه‌های عصبی دارد (۱۱). امروزه بیش تر از دو میلیون نفر در سراسر جهان از این بیماری رنج می-برند. فقدان اطلاعات دقیق اپیدمیولوژی، دانش ضعیف و ابزار محدود تشخیص بر صحت گزارش آمار بیماری MS در بسیاری از کشورها تأثیر معنی‌داری گذاشته است. میزان شیوع بیماری بین ۲ تا ۱۶۰ نفر در هر صد هزار نفر در کشورهای مختلف گزارش شده است. اروپای شمالی و مرکزی، ایتالیا، بخش‌های میانی آمریکای شمالی، مناطقی با خطر بالا برای MS گزارش شده‌اند. شیوع بیماری در نواحی مختلف آسیا نیز متفاوت است (۱۶). در دهه گذشته افزایش شیوع MS در چند کشور آسیایی مانند ایران و ژاپن گزارش شده است. اطلاعات تأیید شده توسط اطلس بین المللی فدراسیون جهانی MS (MSIF)[1] شیوع ۳ نفر در هر صد هزار نفر را در کشور هند ارائه نموده است. بنا به آخرین آمار، شیوع بیماری در ایران ۶۰-۲۰ نفر در هر صد هزار نفر و در استان اصفهان به-میزان ۹۳ نفر در هر صد هزار نفر گزارش شده است (۴). اتیولوژی این بیماری نامشخص است اما عقیده بر این است که بیماری MS مثل دیگر بیماری‌های خود ایمن از تعامل پیچیده فاکتورهای ژنتیکی و عوامل محیطی منشاء می‌گیرد (۱۷). چندین فاکتورمحیطی مثل عفونت‌های ویروسی، استرس وضعیت اجتماعی- اقتصادی، مهاجرت، منطقه جغرافیایی، ماه تولد، رژیم غذایی و میزان در معرض بودن نور خورشید (کمبود ویتامین D) در ابتلای بیماری مؤثر شناخته شده‌اند (۷). از آن‌جایی‌که نقش چندین ژن در ایجاد بیماری MS شناسایی شده است، محققان بر این باورند که رابطه پیچیده بین ژن‌های مستعدکننده و محیط باعث اختلال در مسیرهای التهابی، تخریب میلین‌ها و تخریب بافت در سیستم اعصاب مرکزی (CNS)[2] می‌گردد. علامت مشخصه چنین بیماری‌های پیچیده ژنتیکی، تغییر در تعداد زیادی از ژن‌ها است که در استعداد ابتلا به بیماری نقش دارند. اعتقاد بر این است که تعامل ژن به ژن (که اثرهای اپی‌ستاتیک نامیده می-شود) نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های پیچیده دارد (۱۹).

[1] - Multiple sclerosis international federation
[2]- Central Nerve System

پاتوژنز بیماری MS به این صورت است که در فاز اول آنتی-ژن‌های خودی توسط سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن (APC)[3] به لنفوسیت‌های T ارائه شده، این لنفوسیت‌های T فعال شده از سد مغزی خونی (BBB)[4] عبور کرده به CNS وارد شده، در CNS سلول‌های فعال شده، دوباره با آنتی‌ژن های خودی برخورد کرده و تحت تأثیر سیتوکین‌های التهابی مثل IL-6، IL-7 و TNFα به سلول‌هایTh1 و Th17 تمایز می‌یابد (۱۰). در فاز دوم سیتوکین‌ها و کموکاین‌های تولید شده باعث فعال شدن اولیگودندروسیت‌های موضعی و جلب ماکروفاژها می‌گردد. ماکروفاژها نیز سیتوکین‌هایی ترشح می‌کنند که باعث تخریب غلاف میلین در نورون‌ها می‌گردد و چنان‌چه این پروسه ادامه یابد، آسیب دائمی به CNS وارد می‌شود (۱۲). بیماری شامل چهار فنوتایپ مختلف است: (RRMS)[5] با عود و بهبود کامل که اکثریت بیماران یعنی حدود ۸۵ درصد را تشکیل می‌دهند. [6] (PPMS) با پیشرفت مزمن بیماری مشخص می‌شود و شروع بیماری بدون علائم بالینی است. در ۱۰ درصد بیماران، بیماری به این صورت ظاهر می‌گردد. (SPMS)[7] که با دوره عود شروع شده و پیشرفت مزمن را به-دنبال دارد. (RPMS)[8] حدود ۵۰ درصد از بیماران را شامل شده و با انواع PPMS و SPMS هم‌پوشانی دارد (۱۵). زمینه ژنتیکی مستعد در ابتلا به بیماری MS نقش دارد اگرچه نزدیک به ۹۹/۹ درصد از ژنوم دو فرد مشابه است ولی در بین ۳/۲ میلیارد جفت باز هنوز هم جفت بازهای متفاوتی وجود دارد. انواع مختلفی از پلی‌مورفیسم‌ها در ژنوم وجود دارند که شامل [9] SNPها، تکرارها، حذف‌ها و درج شدگی‌ها هستند. SNPها، واریانت‌هایی از توالی ژنوم هستند که در اثر تغییر یک نوکلئوتید ایجاد می‌شوند. برای این که یک واریانت، SNP محسوب شود، بایستی فراوانی آن در جامعه بیش از ۱ درصد باشد. SNPها ۹۰ درصد واریانت‌های ژنوم را تشکیل می‌دهند و در هر ۱۰۰ تا ۳۰۰ باز، یک SNP وجود دارد و در مناطق کدکننده و غیر کدکننده ژنوم دیده می‌شود. به‌طور کلی SNPهای موجود در ژن‌های مختلف ممکن است در مستعد نمودن افراد در ابتلا به یک بیماری مؤثر باشند و این نکته

[3]- Antigen Presenting Cell
[4]- Blood Brain Barrier
[5] - Relapsing Remitting multiple sclerosis
[6] - Primary Progressive multiple sclerosis
[7] - Secondary Progressive multiple sclerosis
[8] - Relapsing Progressive Multiple Sclerosis

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020

می‌تواند در تخمین شانس ابتلای افراد به بیماری‌های خاص مورد استفاده قرار گیرد (۲۱). بنابراین با مطالعه پلی‌مورفیسم-ها تا حدودی ژن‌های با بیش‌ترین ارتباط در فرآیندهای ایمونولوژیک و پاتوژنزیس بیماری مشخص می‌گردد. اینترلوکین ۴ (IL-4) یک گلیکو پروتئین با وزن مولکولی ۱۸ کیلو دالتون است که سلول‌های Th1 را مهار نموده و در عین حال پاسخ ایمنی از نوع Th2 را القا می‌کند. به‌علاوه اینترلوکین ۴، سنتز سایتوکاینی به نام اینترفرون گاما که عامل تأثیرهای مخرب بیماری MS است را مهار می‌نماید. ژن کدکننده اینترلوکین ۴ در انسان بر روی بازوی بلند کروموزوم ۵ و در موقعیت q۲۱-۳۱ در بین دسته‌ای از ژن‌های سایر سایتوکاین‌ها قرار دارد. ژن گیرنده اینترلوکین ۴ در موقیت ۱۶p۱۱-۱۲ قرار گرفته است و به‌عنوان یکی از ژن‌های مستعد کننده ابتلا به MS است. جانشینی آمینواسید ها به‌ویژه از نوع Missense منجر به ایجاد نوعی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی می‌گردد که در صورت جانشینی آرژینین به جای گلوتامین در موقعیت اسید آمینه ۵۵۱ تأثیر مهمی در پیام‌رسانی گیرنده اینترلوکین ۴ دارد (۹). در حقیقت این SNP با بیماری‌های ایمونولوژیک متعددی که مکانیسمی مشابه MS دارند و وابسته به پاسخ Th1 هستند مانند آسم، حساسیت، دیابت نوع ۱ و بیماری بافت همبند ارتباط دارد (۲۳، ۱۸). تفاوت‌های نژادی و ژنتیکی بین افراد در پاسخ ایمنی، فعال‌سازی، تنظیم و به‌کارگیری سلول‌های T ممکن است بتواند اختلاف در استعداد ابتلا بیماری را توضیح دهد. امروزه مطالعه بر روی ژن‌های دخیل در فرآیند ایمنی مانند ژن‌های مؤثر در فعال سازی سلول‌های T می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در رابطه با استعداد ابتلا به بیماری MS و لوکوس‌های تعدیل ژنی ارائه نماید. مطالعه پلی‌مورفیسم‌های موجود در ژن سایتوکاین‌ها، یک ابزار مفید جهت آنالیزهای انسان‌شناسی به‌منظور پیش بینی استعداد ابتلا به بیماری در جمعیت‌های خاص است. به علاوه این موضوع می‌تواند تفاوت‌های قومی و نژادی مهمی را نشان دهد (۸). با توجه به شیوع بالای بیماری MS در ایران به‌ویژه در استان اصفهان، ابتلا بیماران در سن جوانی و گروه مولد کار، اشغال تخت‌های بیمارستانی و اعمال هزینه‌های سنگین بر سیستم بهداشتی درمانی کشور و هزینه خانوار، گران قیمت بودن داروی اینترفرون و خروج مقدار زیادی ارز از کشور، بر آن شدیم که پلی‌مورفیسم rs1801275 ژن گیرنده اینترلوکین ۴ را در بیماران مبتلا به RRMS مراجعه کننده به کلینیک مرکز تحقیقات MS استان اصفهان با هدف بررسی ارتباط این واریانت ژنتیکی و احتمال ابتلا به بیماری MS را بررسی نماییم.

روش کار

جمع آوری نمونه، استخراج DNA و طراحی پرایمرها

در مطالعه مورد-شاهدی حاضر ۱۰۰ نفر بیمار مبتلا به RRMS پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از بیماران از کلینیک مرکز درمانگاه MS استان اصفهان انتخاب شدند و از آنان ۳ سی‌سی خون روی ضد انعقاد EDTA[۱۰] جمع‌آوری شد. هم-چنین نمونه خون از ۱۰۰ فرد سالم بدون سابقه ابتلا به بیماری عفونی و التهابی و بیماری‌های خود ایمنی (همسان از نظر سن و جنس) مراجعه کننده به سازمان انتقال خون تهیه شد.

سپس DNA ژنومی با استفاده از کیت (Genet Bio - Korea) بر اساس دستورالعمل کیت استخراج شد. در ادامه پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار Primer 3 طراحی شده و سپس در سایت NCBI بلاست انجام شد و تأیید گردید. پرایمرهای موردنظر به‌منظور سنتز به شرکت ژن فناوران سفارش داده شد. پس از سنتز، پرایمرها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای آزمایش‌ها نگهداری شد. در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

جدول ۱. پرایمرهای مناسب برای پلی‌مورفیسم A/G (rs1801275)

	توالی(3´ _ 5´)	طول(bp)	دما(°C)	CG (%)	سایز باند
Forward	GCCGAAATGTCCTCCAGCAT	۲۰	۶۰/۵۰	۵۵	۲۱۴
Reverse	TGCTCCACCGCATGTACAA	۱۹	۵۷/۳	۵۲/۶	۲۱۴

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020

تکنیک HRM Real Time PCR [10]

HRM یک روش جدید و همگن بعد از تکثیر PCR است که در یک سیستم مدار بسته انجام می‌شود. مزیت HRM این است که بعد از PCR به الکترفورز نیاز ندارد. این روش آنالیز تغییرهای ژنتیکی (SNPها، موتاسیون‌ها و متیلاسیون‌ها) در محصول‌های PCR را مقدور می‌سازد. HRM نمونه‌های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و حجم CG متمایز می‌سازد. آنالیز HRM شامل تکثیر ژن مورد نظر در قطعه‌های ۸۰bp تا ۲۵۰bp در واکنشی است که محتوی رنگ متصل شونده به DNA دو رشته‌ای فلورسنت است. بعد از PCR محصول‌ها به-تدریج دناتوره (ذوب) شده و نتیجه آن کاهش فلورسنس است. در این روش بررسی تغییرهای فلورسنس محصول‌های اساس مطالعه تغییرهای ژنتیکی در محصول‌های PCR است. در جدول‌های ۲ و ۳ شرایط بهینه برای PCR و HRM آورده شده است.

جدول ۲. شرایط دمایی و برنامه زمانی بهینه جهت انجام آنالیز PCR

سیکل	زمان	دما	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۴	دناتوره اولیه
۳۰	۳۰ ثانیه	۹۴	دناتوره
	۲۵ ثانیه	۵۸	اتصال
	۳۵ ثانیه	۷۲	گسترش
۱	۵ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی

جدول ۳. شرایط دمایی و برنامه زمانی بهینه جهت انجام آنالیز HRM

سیکل	زمان	دما	مرحله
۴۰	۱۵دقیقه	۹۵	انتظار
	۱۵ ثانیه	۹۵	دنانوره اولیع
	۲۰ ثانیه	۶۰	اتصال
	۲۰ ثانیه	۷۲	گسترش

تکنیک الکتروفورز

قبل از شروع HRM به‌منظور ارزیابی DNAهای استخراج شده، Traditional PCR مورد بررسی کیفی قرار گرفت محصول‌های تکثیر شده، حاصل از پرایمرها با روش PCR توسط ژل الکترفورز ۱/۵ در صد بررسی و ژل در Gel Doc (Vilber Lourmat) قرار داده شد و باندهای DNA مشاهده شد.

روش آنالیز آماری

پس از پایان آزمایش‌ها، برای تجزیه و تحلیل آماری ویژگی‌های جمعیتی پلی‌مورفیسم از فاکتورهای فراوانی آللی، درجه هتروزیگوتی و شاخص PIC[11] استفاده شد. میزان اطلاع دهندگی، گسترش و میزان بیان یک پلی‌مورفیسم در یک جمعیت توسط فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (PIC) اندازه‌گیری می‌شود که مقدار آن برای جایگاه‌های ژنی در تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت تعریف می‌شود و به تعداد آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مارکر بستگی دارد. هم‌چنین تعادل هاردی واینبرگ برای پلی‌مورفیسم با استفاده از آزمون دقیق فیشر مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. به‌علاوه با استفاده از آزمون غیر پارامتریک مربع کای در نرم‌افزارSPSS20 ، مقایسه فراوانی پلی‌مورفیسم rs1801275 بین دو گروه بیمار و کنترل و احتمال ابتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس با ضریب اطمینان ۹۵ درصد بررسی شد.

یافته ها

در این مطالعه، جمعیت مورد بررسی در دوگروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در بازه سنی ۴۲-۲۱ سال و گروه شاهد در بازه سنی ۴۸-۴۸ مورد مطالعه قرار گرفتند. در این دو گروه ویژگی‌های دموگرافیک مثل جنس، وضعیت تأهل، میزان تحصیلات، گروه خونی، شغل، سن ابتلا به بیماری و مدت بیماری مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده در جدول ۴ برای دو گروه بیمار و شاهد درج گردید.

[10] - High resolution melting

[11] -Polymorphism information content

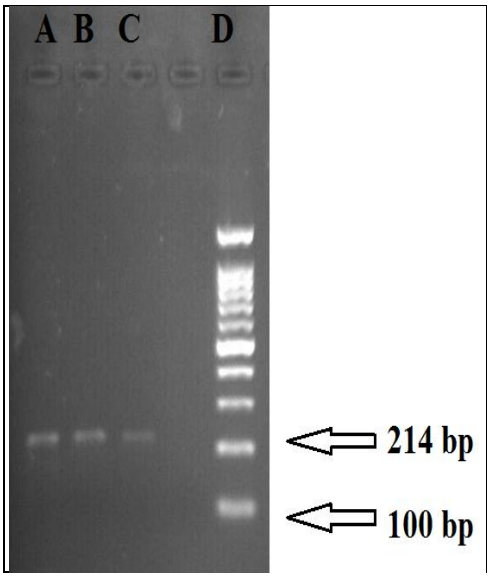
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020

جدول۴. میانگین و توزیع فراوانی متغیرهای دموگرافیک بیماران مبتلا به MS و گروه شاهد شرکت کننده در پژوهش

متغیر	میانگین و انحراف معیار		کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار	
	گروه شاهد	گروه بیمار	گروه شاهد	گروه بیمار
سن(سال)	۵۳/۷±۵۳/۳۲	۳۸/۳۰±۷۹/۵	۴۸-۱۹	۴۲-۲۱
سن ابتلا به بیمای **MS**	---	۹۷/۲۵±۶۴/۷	---	۳۸-۲۲
مدت ابتلا به بیماری **MS**	---	۱۲/۳±۳۴/۲	---	۷-۰

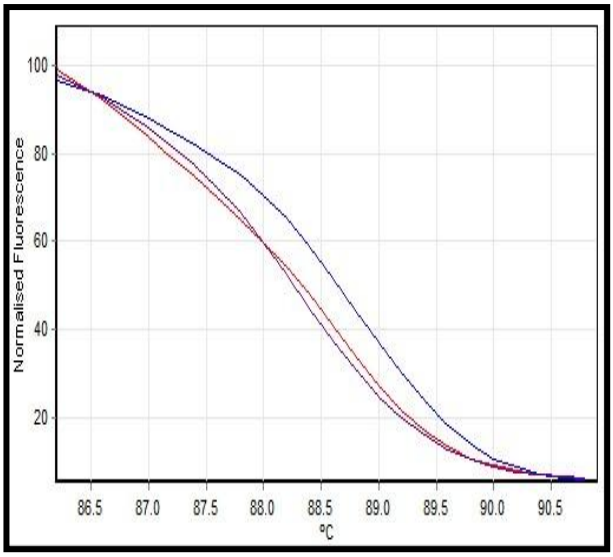
متغیر	تعداد	
	گروه شاهد تعداد	گروه بیمار تعداد
جنسیت		
مرد	۴۶	۳۸
زن	۵۴	۶۲
وضعیت تاهل		
مجرد	۳۲	۳۸
متاهل	۶۸	۶۲
میزان تحصیلات		
زیر دیپلم	۱۳	۲۴
دیپلم	۴۹	۳۷
لیسانس	۲۹	۳۲
بالاتر از لیسانس	۹	۷
گروه خونی		
AB	۲۱	۲۵
A	۳۶	۳۱
B	۲۹	۳۴
O	۱۴	۱۰
مصرف سیگار (بله – خیر)	۳۶	۲۳
	۶۴	۷۷

در ادامه جهت بررسی فراوانی آللی برای پلی‌مورفیسم rs۱۸۰۱۲۷۵ از تکنیک PCR استفاده شد نتایج آنالیز PCR برای این پلی‌مورفیسم نشان داد که افراد دارای پلی‌مورفیسم مذکور دارای باند ژنی به طول ۲۱۴ جفت باز بر روی ژل آگاروز هستند (شکل ۱).



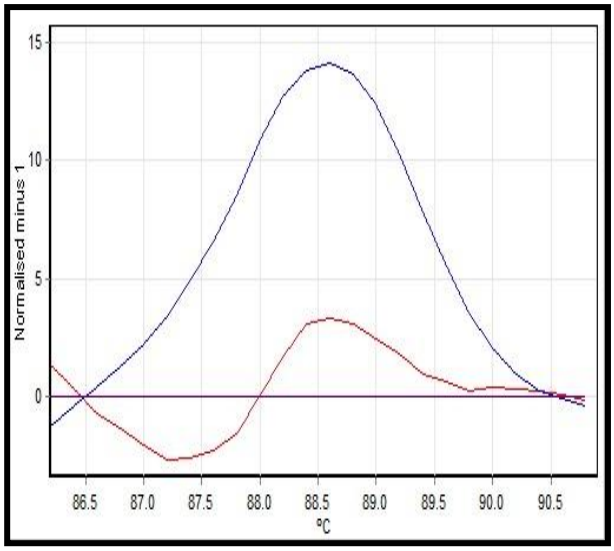
شکل ۱. نتایج PCR: چاهک A هموزیگوت سالم (AA)، چاهک B هتروزیگوت (AG) و چاهک C هموزیگوت بیمار (GG) است. چاهک D مارکر ۱۰۰ bp است.

در این مطالعه جهت بررسی وجود پلی‌مورفیسم rs1801275 در توالی نوکلئوتیدی ژن گیرنده اینترلوکین ۴ از تکنیک HRM-PCR استفاده شد. در شکل ۲ نمودار تغییرهای میزان فلورسانس در بازه‌های مختلف دمایی و در شکل ۳ نمودار نرمال شده تغییرهای میزان فلورسانس در دماهای مختلف نسبت به ژنوتیپ‌های طبیعی و جهش یافته ژن اینترلوکین ۴ نشان داده شده است.



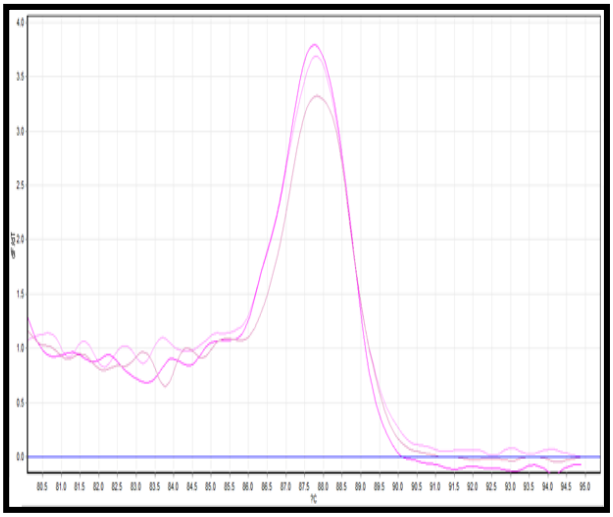
شکل ۲. نمودار نرمال شده تغییرهای میزان فلورسانس در بازه‌های مختلف دمایی

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020



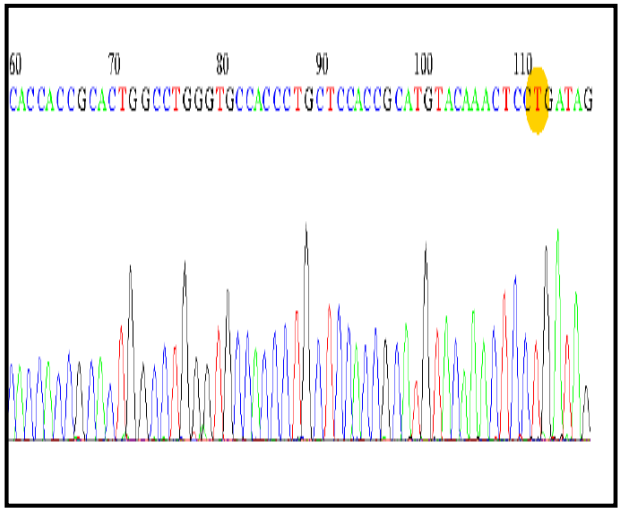
شکل ۳. نمودار نرمال شده تغییرهای میزان فلورسانس در دماهای مختلف نسبت به ژنوتیپ‌های مختلف.

یکی از ویژگی‌های قابل توجه تکنیک HRM-PCR توانایی بالا در تمایز نمونه‌های هتروزیگوت و هموزیگوت است که این کار از طریق نمودارهای Melting curve صورت می‌پذیرد. به‌طور معمول در این نمودارها نمونه‌های هموزیگوت تنها دارای یک پیک هستند در حالی‌که نمونه‌های هتروزیگوت دارای دو پیک نزدیک به‌هم هستند. در شکل ۴ نمودار Melting curve برای ژنوتیپ‌های مختلف رسم شده است.

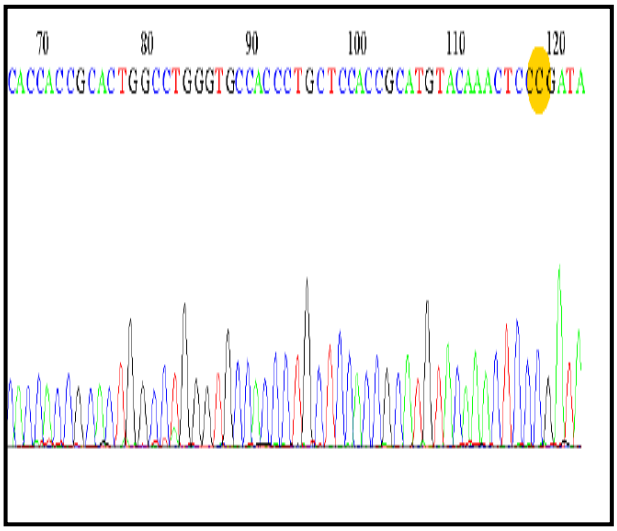


شکل ۴. نمودار Melting curve جهت بررسی تمایز بین نمونه‌های هموزیگوت و هتروزیگوت.

پس از انجام آنالیز HRM و بررسی فراوانی ژنوتیپی نمونه‌های مختلف، تعدادی از نمونه‌ها جهت بررسی صحت نتایج HRM توالی‌یابی شدند. نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی نشان می‌دهد که تکنیک HRM-PCR به‌خوبی قابلیت تفکیک ژنوتیپی نمونه‌ها را داشته و نتایج آن با نتایج حاصل از توالی‌یابی در توافق کامل هستند. در شکل ۵ و ۶ نتیجه توالی‌یابی رشته معکوس DNA برای دو نمونه سالم و جهش یافته نشان داده شده است. مقایسه این دو شکل نشان می‌دهد که در انتهای توالی نوکلئوتیدی رشته جهش یافته و در محل وقوع پلی-مورفیسم اسید نوکلئیک تیمین (T) به سیتوزین (C) تبدیل می‌گردد. که این نتایج با نتایج به‌دست آمده از آنالیز HRM-PCR هم‌خوانی داشت.



شکل ۵. نتایج تعیین توالی رشته معکوس DNA برای نمونه فاقد پلی-مورفیسم rs1801275



شکل ۶. نتایج تعیین توالی رشته معکوس DNA برای نمونه دارای پلی-مورفیسم rs1801275

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020

بررسی‌های آماری

پیش از انجام مقایسه در بین دو گروه از لحاظ فراوانی آللی و ژنوتیپ و بررسی نسبت مشاهده هر یک، ابتدا تعادل هاردی واینبرگ برای پلی‌مورفیسم rs1801275 مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق با جدول ۵، بررسی تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از تست دقیق فیشر برای پلی‌مورفیسم rs1801275 نشان داد که مقدار P-Value برای این مارکر در جمعیت مورد مطالعه برابر (P-Value = 0.27) است. بنابراین در سطح اطمینان ۹۵ درصد این مارکر در جمعیت استان اصفهان در تعادل هاردی- واینبرگ قرار دارد.

جدول ۵. بررسی میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار برای پلی‌مورفیسم rs1801275

هتروزیگوسیتی		هموزیگوسیتی	
مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار
۰/۴۰	۰/۴۵۷	۰/۶۰	۰/۵۴۳

به‌علاوه جهت بررسی میزان اطلاع دهندگی پلی‌مورفیسم rs1801275 از شاخص اطلاع دهندگی پلی‌مورفیسم (PIC) استفاده شد. شاخص اطلاع دهندگی پلی‌مورفیسم معیاری برای اندازه‌گیری میزان گویا بودن یک پلی‌مورفیسم در یک جامعه است و برای پلی‌مورفیسم‌های دو آللی حداکثر مقدار آن برابر ۰/۳۷۵ است. این در حالی است که مقادیر شاخص PIC بزرگ‌تر از ۰/۲۵ نشان دهنده اطلاع دهندگی بالا و گویا بودن یک پلی‌مورفیسم در جامعه مورد مطالعه است. شاخص PIC اندازه‌گیری شده برای پلی‌مورفیسم rs1801275 برابر با ۰/۳۵۱۵ است که نشان از گویا بودن این مارکر و اطلاع دهندگی بالای آن در جمعیت انسانی مورد مطالعه است. از سوی دیگر، نتایج حاصل از بررسی ارتباط بین وجود پلی-مورفیسم rs1801275 و ابتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی توالی نوکلئوتیدی با استفاده تکنیک HRM-PCR نشان داد که فراوانی آللی برای پلی-مورفیسم rs1801275 در گروه شاهد و بیمار به‌ترتیب برابر با ۳۵ درصد و ۵۱ درصد بوده و شانس مشاهده آلل A در مقایسه با آلل G در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد ۰/۵۱۷ برابر بوده است، به بیان دیگر مشاهده آلل G در بیماران نسبت به افراد سالم به‌طور معناداری بیش‌تر بوده است (جدول ۶). بنابراین می توان نتیجه گرفت که بین وجود پلی‌مورفیسم rs1801275 و احتمال ابتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس ارتباط معناداری وجود دارد (χ^2=۵/۲۲۲ و P-Value=۰/۰۲۲). از سوی دیگر در بررسی هر یک از ژنوتایپ‌های این پلی‌مورفیسم مشخص شد که در گروه شاهد ۴۵ درصد از افراد دارای ژنوتیپ طبیعی، ۴۰ درصد هتروزیگوت و ۱۵ درصد دارای ژنوتیپ هموزیگوت برای پلی‌مورفیسم rs1801275 هستند در حالی‌که در گروه بیماران ۲۰ درصد از افراد دارای ژنوتیپ طبیعی، ۵۸ درصد هتروزیگوت و ۲۲ درصد دارای ژنوتیپ هموزیگوت هستند. بنابراین نسبت شانس مشاهده ژنوتیپ هتروزیگوت در بیماران و افراد سالم در مقایسه با ژنوتیپ هموزیگوت یکسان بوده و اختلاف معناداری نداشته است ولی به‌طور قابل ملاحظه و معناداری شانس مشاهده ژنوتیپ طبیعی در افراد بیمار نسبت به افراد سالم کم-تر بوده است (P_Value=۰/۰۰۶، OR=۰/۳۰۳).

جدول ۶. بررسی فراوانی آللی پلی‌مورفیسم rs1801275 با استفاده از نتایج حاصل از تکنیک HRM-PCR

پلی مورفیسم	گروه شاهد	گروه مورد	OR (CI 95%)	سطح معناداری
A	(٪۶۵)۶۵	(٪۴۹)۴۹	(۰/۲۹۳-۰/۹۱۳) ۰/۵۱۷	۰/۰۲۲
G	(٪۳۵)۳۵	(٪۵۱)۵۱		
		ژنوتایپینگ		
جهش (GG)	(٪۱۵)۱۵	(٪۲۲)۲۲	Reference	-
هتروزیگوت (AG)	(٪۴۰)۴۰	(٪۵۸)۵۸	(۰/۴۵۸-۲/۱۳۵) ۰/۹۸۹	۰/۹۷۷
طبیعی (AA`)	(٪۴۵)۴۵	(٪۲۰)۲۰	(۰/۱۳۱-۰/۷۰۳) ۰/۳۰۳	۰/۰۰۶

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020

بحث

امروزه بسیاری از پژوهش‌های انجام شده نشان دهنده نقش پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژن اینترلوکین ۴ در ابتلا و پیشرفت بیماری مالتیپل اسکلروزیس است. به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌های بروبرگ و همکاران نشان داد که تغییرهای بیان ژن اینترلوکین ۴ می‌تواند در مهار التهاب بیماری مالتیپل اسکلروزیس نقش داشته باشد (۲). بررسی پژوهش‌های انجام شده بر روی پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژن اینترلوکین ۴ توسط Hackstein و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که انواعی از این پلی‌مورفیسم ها مانند D16S407، 3093D16S و 420D16S در استعداد ابتلا به بیماری MS نقش دارند (۶). هم‌چنین Mirel و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی‌های خود بر روی افراد مبتلا به دیابت، دریافتند که ارتباط آشکاری بین پلی‌مورفیسم ژن اینترلولین ۴ (C76080 >T) و استعداد ابتلا به بیماری‌های خود ایمنی وجود دارد (۱۴). در مطالعه‌ای دیگر Mirel و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی‌های خود بر روی افراد مبتلا به MS، دریافتند که ارتباط آشکاری بین پلی‌مورفیسم ژن 128387 (IL-4RG>A) و استعداد ابتلا به این بیماری وجود دارد (۱۳). Vazquez-Tello و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی پلی‌مورفیسم تک-نوکلئوتیدیrs1805010 و rs1801275 در ژن اینترلوکین ۴ پرداختند. آن‌ها دریافتند که این پلی‌مورفیسم‌ها با افزایش خطر ابتلا به آسم همراه است (۲۲). Guia و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌های خود روی بیماران مبتلا به آسم دریافتند که ارتباط مستقیمی بین سطوح افزایش یافته IL-4 و پلی‌مورفیسم rs2243250 ژن اینترلوکین ۴ وجود دارد (۳). در نهایت Al-Muhsen و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌های خود روی بیماران مبتلا به آسم درجمعیت عربستان سعودی دریافتند، پلی‌مورفیسم‌های rs1805010 و rs1801275 ژن IL-4Rα استعداد ابتلا به آسم را افزایش می‌دهد (۱). اما مطالعه‌ایی در زمینه پلی‌مورفیسم rs1801275 ژن IL-4Rα در بیماری MS انجام نشده است لذا در ادامه مطالعه‌های قبلی، تحقیق حاضر طراحی شد که نتایج آن نشان می‌دهد فراوانی آللی G برای پلی‌مورفیسم rs1801275 در گروه شاهد و بیمار به‌صورت معناداری متفاوت است و بنابراین فراوانی آلل G می‌تواند در افزایش احتمال ابتلا به بیماری MS نقش داشته باشد (χ^2 = 5.222 و P-Value = 0.22). علاوه‌براین مطالعه-های جمعیتی انجام شده برروی پلی‌مورفیسم rs1801275 نشان می‌دهد که این پلی‌مورفیسم دارای اطلاع دهندگی بسیار بالایی در جامعه انسانی استان اصفهان بوده و بنابراین به‌نظر می‌رسد ریسک فاکتوری در جهت احتمال بروز بیماری مالتیپل اسکلروزیس باشد.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که در بیماران مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس فراوانی آلل G برای پلی‌مورفیسم rs1801275 به-صورت معناداری افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بین وجود پلی‌مورفیسم rs1801275 و احتمال ابتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس ارتباط معناداری وجود دارد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد (کد: ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۵۲۰۲۵) است. بدین‌وسیله نویسندگان از تمام افرادی که در جمع آوری نمونه‌های خون در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020

منابع

1. Al-Muhsen S, Vazquez-Tello A, Alzaabi A, Al-Hajjaj MS, Al-Jahdali HH, Halwani R. IL-4 receptor alpha single-nucleotide polymorphisms rs1805010 and rs1801275 are associated with increased risk of asthma in a Saudi Arabian population. Annals of thoracic medicine. 2014;9(2):81.
2. Broberg EK, Salmi AA, Hukkanen V. IL-4 is the key regulator in herpes simplex virus-based gene therapy of BALB/c experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroscience letters. 2004;364(3):173-8.
3. de Guia RM, Ramos JD. The-590C/T IL4 single-nucleotide polymorphism as a genetic factor of atopic allergy. Int J MolEpidemiol Genet. 2010; 1(1):67-73.
4. Etemadifar M, Abtahi SH. Multiple Sclerosis in Isfahan: past, present and future. International journal of preventive medicine. 2012; 3(5): 12-18.
5.Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. Immunological reviews. 2012; 248(1):87-103.
6.Hackstein H, Bitsch A, Bohnert A, Hofmann H, Weber F, Ohly A, Linington C, Mäurer M, Poser S, Rieckmann P, Bein G. Analysis of interleukin-4 receptor α chain variants in multiple sclerosis. Journal of neuroimmunology. 2001; 113(2):240-8.
7. Kalman B, Albert RH, Leist TP. Genetics of multiple sclerosis: determinants of autoimmunity and neurodegeneration. Autoimmunity. 2002; 35(4):225-34.
8. Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. Current opinion in neurology. 2006; 19(3):248-54.
9. Kruse S, Braun S, Deichmann KA. Distinct signal transduction processes by IL-4 and IL-13 and influences from the Q551R variant of the human IL-4 receptor alpha chain. Respiratory research. 2002; 3(1):1.
10. Lassmann H. What drives disease in multiple sclerosis: inflammation or neurodegeneration? Clinical and Experimental Neuroimmunology. 2010; 1(1):2-11.
11. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. Nature immunology. 2007;8(9):913-9.
12. Minderhoud JM, Hoeven JH, Prange AJ. Course and prognosis of chronic progressive multiple sclerosis: results of an epidemiological study. Actaneurologicascandinavica. 1988;78(1):10-5.
13. Mirel DB, Barcellos LF, Wang J, Hauser SL, Oksenberg JR, Erlich HA. Analysis of IL4R haplotypes in predisposition to multiple sclerosis. Genes and immunity. 2004; 5(2):138-41.
14. Mirel DB, Valdes AM, Lazzeroni LC, Reynolds RL, Erlich HA, Noble JA. Association of IL4R haplotypes with type 1 diabetes. Diabetes. 2002; 51(11):3336-41.
15. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. Nature Reviews Genetics. 2008;9(7):516-26.
16. Pandit L, Ban M, Sawcer S, Singhal B, Nair S, Radhakrishnan K, Shetty R, Misri Z, Hegde S, Bhat IG. Evaluation of the established non-MHC multiple sclerosis loci in an Indian population. Multiple Sclerosis Journal. 2011; 17(2):139-43.
17. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. The Lancet Neurology. 2010;9(7):727-39.
18. Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, Robertson N, Clayton D, Goodfellow PN, Compston A. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. Nature genetics. 1996; 13(4):464-8.
19. Serra C, Mameli G, Arru G, Sotgiu S, Rosati G, Dolei A. In vitro modulation of the multiple sclerosis (MS)-associated retrovirus by cytokines: implications for MS pathogenesis. Journal of neurovirology. 2003; 9(6):637-43.
20. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. Annu. Rev. Immunol. 2005; 23:683-747.
21. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. Nature Reviews Genetics. 2002;3(5):391-7.

22. Vazquez-Tello A, Halwani R, Jamhawi A, Al-Dosari MS, Al-Muhsen S. Il-4 receptor alpha single nucleotide polymorphisms rs1805010 and rs1801275 are associated with increased risk of asthma in a Saudi Arabian population. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013;68:691.
23. Watson CT, Disanto G, Breden F, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Estimating the proportion of variation in susceptibility to multiple sclerosis captured by common SNPs. Scientific reports. 2012; 2:770.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:51 +0330 on Sunday October 25th 2020