

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

مالتیپلاسکلروزیس در شهر اصفهان

مریم آزادی^{۱،۵}، فرشته آل صاحب فصول^{۲،۵*}، رسول صالحی^۳، الهه تاجبخش^۱، مسعود اعتمادی^{۴،۵}

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 نوروایمونولوژی اصفهان
۵. گروه داخلی اعصاب دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

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 پلی مورفیسم 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 پلی مورفیسم rs1801275 ژن گیرنده اینترلوکین ۴ در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد به‌صورت معناداری افزایش پیدا کرده است (P-Value=۰/۰۲۲).

نتیجه‌گیری: پلی مورفیسم rs1801275 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

مالتیپلاسکلروزیس (MS)^۱ 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 ۲-۳ 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

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 می‌برند. 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 بین‌المللی فدراسیون جهانی MS (MSIF)^۱ 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 فاکتور محیطی 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 آنجایی که 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)^۲ 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 می‌شود) نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های پیچیده دارد (۱۹).

پاتوژنز بیماری MS به این صورت است که در فاز اول آنتی-ژن‌های خودی توسط سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن (APC)^۳ به لنفوسیت‌های T ارائه شده، این لنفوسیت‌های T فعال شده از سد مغزی خونی (BBB)^۴ عبور کرده به CNS وارد شده، در CNS سلول‌های فعال شده، دوباره با آنتی‌ژن‌های خودی برخورد کرده و تحت تأثیر سیتوکین‌های التهابی مثل IL-6، IL-7 و TNF α به سلول‌های Th1 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)^۵ با عود و بهبود کامل که اکثریت بیماران یعنی حدود ۸۵ درصد را تشکیل می‌دهند. (PPMS)^۶ با پیشرفت مزمن بیماری مشخص می‌شود و شروع بیماری بدون علائم بالینی است. در ۱۰ درصد بیماران، بیماری به این صورت ظاهر می‌گردد. (SPMS)^۷ که با دوره عود شروع شده و پیشرفت مزمن را به-دنبال دارد. (RPMS)^۸ 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 ۹ 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

¹ - Multiple sclerosis international federation

² - Central Nerve System

علاوه این موضوع می تواند تفاوت های قومی و نژادی مهمی را نشان دهد (۸). با توجه به شیوع بالای بیماری MS در ایران به ویژه در استان اصفهان، ابتلا بیماران در سن جوانی و گروه مولد کار، اشغال تخت های بیمارستانی و اعمال هزینه های 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 پلی مورفیسم 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 رضایت نامه کتبی از بیماران از کلینیک مرکز درمانگاه MS استان اصفهان انتخاب شدند و از آنان ۳ سی سی خون روی ضد انعقاد EDTA^۱ جمع آوری شد. هم-چنین نمونه خون از ۱۰۰ فرد سالم بدون سابقه ابتلا به بیماری عفونی و التهابی و بیماری های 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 نرم افزار Primer 3 طراحی شده و سپس در سایت NCBI بلاست انجام شد و تأیید گردید. پرایمرهای مورد نظر به منظور سنتز به شرکت ژن فناوری سفارش داده شد. پس از سنتز، پرایمرها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای آزمایش ها نگهداری شد. در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

می تواند در تخمین شانس ابتلای افراد به بیماری های خاص مورد استفاده قرار گیرد (۲۱). بنابراین با مطالعه پلی مورفیسم-ها تا حدودی ژن های با بیشترین ارتباط در فرآیندهای ایمونولوژیک و پاتوژنیز بیماری مشخص می گردد. اینترلوکین ۴ (IL-4) یک گلیکو پروتئین با وزن مولکولی ۱۸ کیلو دالتون است که سلول های Th1 را مهار نموده و در عین حال پاسخ ایمنی از نوع Th2 را القا می کند. به علاوه اینترلوکین ۴، سنتز سایتوکاینی به نام اینترفرون گاما که عامل تأثیرهای مخرب بیماری MS است را مهار می نماید. ژن کدکننده اینترلوکین ۴ در انسان بر روی بازوی بلند کروموزوم ۵ و در موقعیت ۳۱-۲۱q در بین دسته ای از ژن های سایر سایتوکاین ها قرار دارد. ژن گیرنده اینترلوکین ۴ در موقعیت ۱۲-۱۱p قرار گرفته است و به عنوان یکی از ژن های مستعد کننده ابتلا به MS است. جانیشینی آمینواسید ها به ویژه از نوع Missense منجر به ایجاد نوعی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی می گردد که در صورت جانیشینی آرژینین به جای گلوتامین در موقعیت اسید آمینه ۵۵۱ تأثیر مهمی در پیام رسانی گیرنده اینترلوکین ۴ دارد (۹). در حقیقت این SNP با بیماری های 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). تفاوت های نژادی و ژنتیکی بین افراد در پاسخ ایمنی، فعال سازی، تنظیم و به کارگیری سلول های T ممکن است بتواند اختلاف در استعداد ابتلا بیماری را توضیح دهد. امروزه مطالعه بر روی ژن های دخیل در فرآیند ایمنی مانند ژن های مؤثر در فعال سازی سلول های T می تواند اطلاعات ارزشمندی در رابطه با استعداد ابتلا به بیماری MS و لوکوس های تعدیل ژنی ارائه نماید. مطالعه پلی مورفیسم های موجود در ژن سایتوکاین ها، یک ابزار مفید جهت آنالیزهای انسان شناسی به منظور پیش بینی استعداد ابتلا به بیماری در جمعیت های خاص است. به

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

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

تکنیک^{۱۰} HRM Real Time PCR

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 الکتروفورز نیاز ندارد. این روش آنالیز تغییرهای ژنتیکی (SNPها، موتاسیون‌ها و متیلاسیون‌ها) در محصول‌های PCR را مقدر می‌سازد. HRM نمونه‌های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و حجم CG متمایز می‌سازد. آنالیز HRM شامل تکثیر ژن مورد نظر در قطعه‌های ۸۰ bp تا ۲۵۰ bp 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

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

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

مرحله	دما	زمان	سیکل
انتظار	۹۵	۱۵ دقیقه	۴۰
دنا توره اولیه	۹۵	۱۵ ثانیه	
اتصال	۶۰	۲۰ ثانیه	
گسترش	۷۲	۲۰ ثانیه	

تکنیک الکتروفورز

قبل از شروع HRM به منظور ارزیابی DNAهای استخراج شده، Traditional PCR مورد بررسی کیفی قرار گرفت محصول‌های تکثیر شده، حاصل از پرایمرها با روش PCR توسط ژل الکتروفورز 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^{۱۱} 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 نرم‌افزار SPSS20، مقایسه فراوانی پلی‌مورفیسم rs1801275 بین دو گروه بیمار و کنترل و احتمال ابتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس با ضریب اطمینان ۹۵ درصد بررسی شد.

یافته‌ها

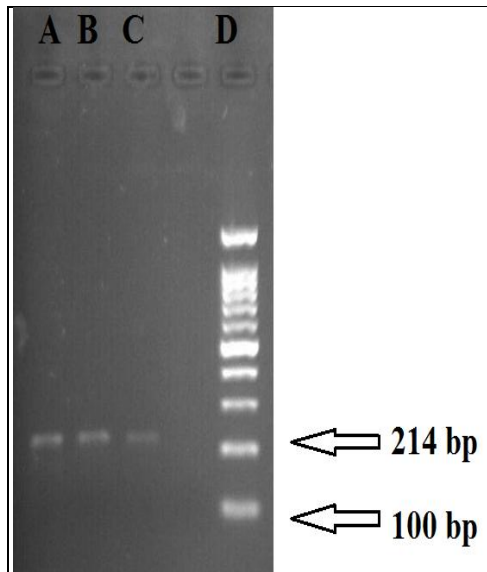
در این مطالعه، جمعیت مورد بررسی در دو گروه بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در بازه سنی ۲۱-۴۲ سال و گروه شاهد در بازه سنی ۴۸-۴۸ مورد مطالعه قرار گرفتند. در این دو گروه ویژگی‌های دموگرافیک مثل جنس، وضعیت تأهل، میزان تحصیلات، گروه خونی، شغل، سن ابتلا به بیماری و مدت بیماری مورد بررسی قرار گرفت و نتایج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

¹¹ - Polymorphism information content

¹⁰ - High resolution melting

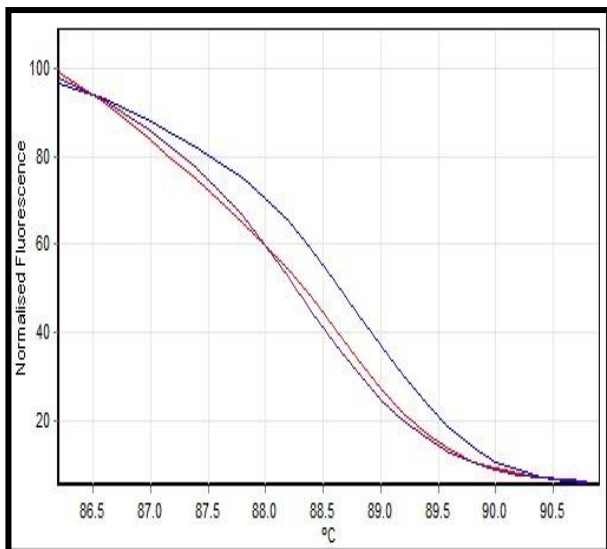
جدول ۴. میانگین و توزیع فراوانی متغیرهای دموگرافیک بیماران مبتلا به MS و گروه شاهد شرکت کننده در پژوهش

کمترین و بیشترین مقدار		میانگین و انحراف معیار		متغیر
گروه بیمار	گروه شاهد	گروه بیمار	گروه شاهد	
۴۲-۲۱	۴۸-۱۹	۳۸/۳۰±۷۹/۵	۵۳/۷±۵۳/۳۲	سن (سال)
۳۸-۲۲	---	۹۷/۲۵±۶۴/۷	---	سن ابتلا به بیماری MS
۷-۰	---	۱۲/۳±۳۴/۲	---	مدت ابتلا به بیماری MS
تعداد				متغیر
گروه بیمار تعداد		گروه شاهد تعداد		
۲۸	۶۲	۴۶	۵۴	جنسیت
				مرد
				زن
۲۸	۶۲	۳۲	۶۸	وضعیت تاهل
				مجرد
				متاهل
۲۴	۲۷	۱۳	۴۹	میزان تحصیلات
				زیر دیپلم
				دیپلم
۳۲	۷	۲۹	۹	لیسانس
				بالتر از لیسانس
				گروه خونی
۲۵	۳۱	۲۱	۳۶	AB
				A
۳۴	۱۰	۲۹	۱۴	B
				O
۲۳	۷۷	۳۶	۶۴	مصرف سیگار
				(بله - خیر)



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.

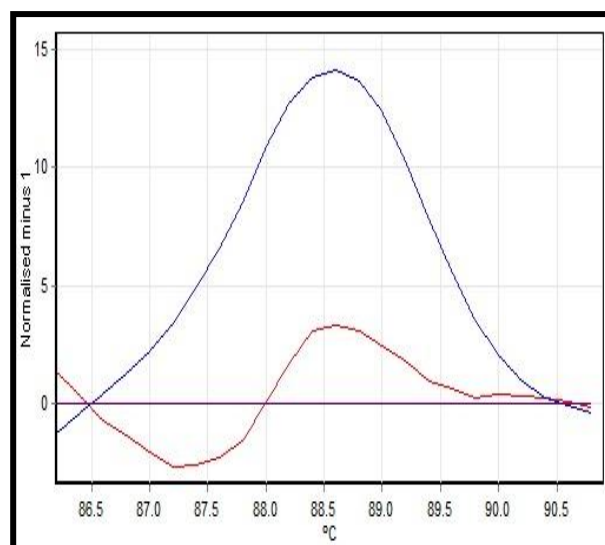
در این مطالعه جهت بررسی وجود پلی مورفیسم rs1801275 در توالی نوکلئوتیدی ژن گیرنده اینترلوکین ۴ از تکنیک HRM-PCR استفاده شد. در شکل ۲ نمودار تغییرهای میزان فلورسانس در بازه های مختلف دمایی و در شکل ۳ نمودار نرمال شده تغییرهای میزان فلورسانس در دماهای مختلف نسبت به ژنوتیپ های طبیعی و جهش یافته ژن اینترلوکین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



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

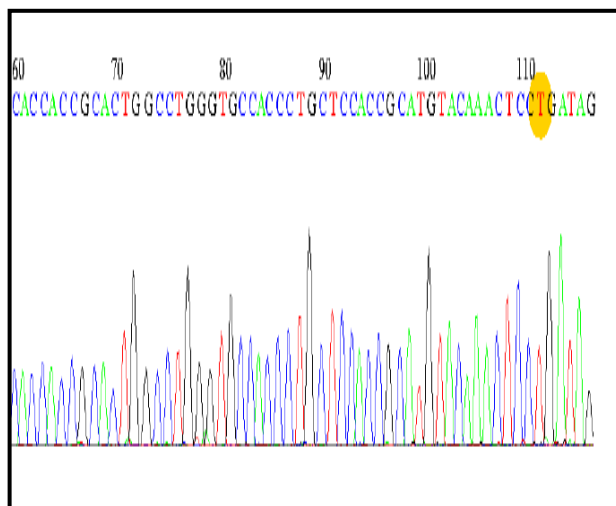
در ادامه جهت بررسی فراوانی آلی برای پلی مورفیسم rs1801275 از تکنیک PCR استفاده شد نتایج آنالیز PCR برای این پلی مورفیسم نشان داد که افراد دارای پلی مورفیسم مذکور دارای باند ژنی به طول ۲۱۴ جفت باز بر روی ژل آگاروز هستند (شکل ۱).

که تکنیک HRM-PCR به خوبی 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 به دست آمده از آنالیز HRM-PCR هم‌خوانی داشت.

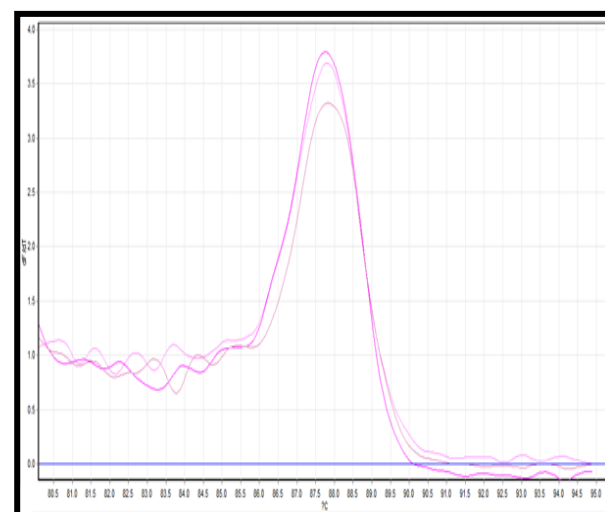


شکل ۳. نمودار نرمال شده تغییرهای میزان فلورسانس در دماهای مختلف نسبت به ژنوتیپ‌های مختلف.

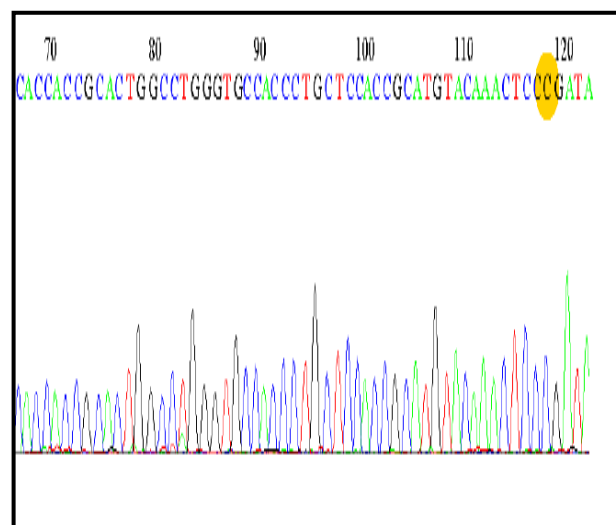
یکی از ویژگی‌های قابل توجه تکنیک HRM-PCR توانایی بالا در تمایز نمونه‌های هتروزیگوت و هموزیگوت است که این کار از طریق نمودارهای Melting curve صورت می‌پذیرد. به طور معمول در این نمودارها نمونه‌های هموزیگوت تنها دارای یک پیک هستند در حالی که نمونه‌های هتروزیگوت دارای دو پیک نزدیک به هم هستند. در شکل ۴ نمودار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



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



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



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

پس از انجام آنالیز HRM و بررسی فراوانی ژنوتیپی نمونه‌های مختلف، تعدادی از نمونه‌ها جهت بررسی صحت نتایج HRM توالی‌یابی شدند. نتایج به دست آمده از توالی‌یابی نشان می‌دهد

بررسی های آماری

پیش از انجام مقایسه در بین دو گروه از لحاظ فراوانی آلی و ژنوتیپ و بررسی نسبت مشاهده هر یک، ابتدا تعادل هاردی واینبرگ برای پلی مورفیسم rs1801275 مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق با جدول ۵، بررسی تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از تست دقیق فیشر برای پلی مورفیسم 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 پلی مورفیسم rs1801275

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

به علاوه جهت بررسی میزان اطلاع دهندگی پلی مورفیسم rs1801275 از شاخص اطلاع دهندگی پلی مورفیسم (PIC) استفاده شد. شاخص اطلاع دهندگی پلی مورفیسم معیاری برای اندازه گیری میزان گویا بودن یک پلی مورفیسم در یک جامعه است و برای پلی مورفیسم های دو آلی حداکثر مقدار آن برابر ۰/۳۷۵ است. این در حالی است که مقادیر شاخص PIC بزرگ تر از ۰/۲۵ نشان دهنده اطلاع دهندگی بالا و گویا بودن یک پلی مورفیسم در جامعه مورد مطالعه است. شاخص PIC اندازه گیری شده برای پلی مورفیسم 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 آلی برای پلی-مورفیسم rs1801275 در گروه شاهد و بیمار به ترتیب 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 به طور معناداری بیش تر بوده است (جدول ۶). بنابراین می توان نتیجه گرفت که بین وجود پلی مورفیسم rs1801275 و احتمال ابتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس ارتباط معناداری وجود دارد ($\chi^2=5/222$ و $P\text{-Value}=0/022$). از سوی دیگر در بررسی هر یک از ژنوتایپ های این پلی مورفیسم مشخص شد که در گروه شاهد ۴۵ درصد از افراد دارای ژنوتیپ طبیعی، ۴۰ درصد هتروزیگوت و ۱۵ درصد دارای ژنوتیپ هموزیگوت برای پلی مورفیسم rs1801275 هستند در حالی که 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 به طور قابل ملاحظه و معناداری شانس مشاهده ژنوتیپ طبیعی در افراد بیمار نسبت به افراد سالم کم-تر بوده است ($OR=0/303$, $P\text{-Value}=0/006$).

جدول ۶. بررسی فراوانی آلی پلی مورفیسم rs1801275 با استفاده از نتایج حاصل از تکنیک HRM-PCR

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

بحث

امروزه بسیاری از پژوهش‌های انجام شده نشان دهنده نقش پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژن اینترلوکین ۴ در ابتلا و پیشرفت بیماری مالتیپل اسکروزیس است. به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌های بروبرگ و همکاران نشان داد که تغییرهای بیان ژن اینترلوکین ۴ می‌تواند در مهار التهاب بیماری مالتیپل اسکروزیس 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 پلی‌مورفیسم‌ها مانند D16S407, D16S3093 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 اینترلوکین ۴ ($T > C76080$) 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-نوکلئوتیدی rs1805010 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 در جمعیت عربستان سعودی دریافتند، پلی‌مورفیسم‌های rs1805010 و rs1801275 IL-4R α استعداد ابتلا به آسم را افزایش می‌دهد (۱). اما مطالعه‌ای در زمینه پلی‌مورفیسم rs1801275 ژن IL-4R α 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 ($\chi^2 = 5.222$ و $P\text{-Value} = 0.22$). علاوه‌براین مطالعه-های جمعیتی انجام شده بر روی پلی‌مورفیسم rs1801275 نشان می‌دهد که این پلی‌مورفیسم دارای اطلاع دهنده‌گی بسیار بالایی در جامعه انسانی استان اصفهان بوده و بنابراین به‌نظر می‌رسد ریسک فاکتوری در جهت احتمال بروز بیماری مالتیپل اسکروزیس باشد.

نتیجه‌گیری

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

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.