

بررسی پلی مورفیسم‌های 1015A/C , 1112C/T , 1055C/T منطقه پروموتوری ژن ۴-L در بیماران مبتلا به MS شهر زنجان

سینا میرزا احمدی^۱، ساناز مهمازی^۲، هدایتیان شیرازی^۳

^۱استادیار گروه زیست شناسی- ژنتیک مولکولی و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

^۲استادیار گروه زیست شناسی- ژنتیک مولکولی و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

^۳کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

چکیده

بیماری مولتیپل اسکلروز یک بیماری خود ایمنی است که غلاف میلین اطراف نورون‌ها را در سیستم اعصاب مرکزی درگیر می‌کند. عوامل مختلفی اعم از فاکتورهای محیطی و فاکتورهای ژنتیکی در بروز آن دخیل هستند. در ایجاد این بیماری لنفوسیت‌های T و B نقش مهمی دارند و باعث ترشح سیتوکین‌هایی مانند IL-13 و آنتی‌بادی می‌شوند. وجود پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن‌هایی که در بروز این بیماری دخیل هستند می‌تواند بر میزان بروز بیماری تاثیرگذار باشد. در این مطالعه تاثیر پلی مورفیسم‌های موجود در ناحیه پروموتوری ژن IL-13 با شیوع بیماری در جمعیت ایرانی (شهر زنجان) بررسی شد. ابتدا نمونه‌های خون از بیماران و افراد سالم گرفته و سپس استخراج DNA از آن صورت گرفت. سپس تکنیک PCR-RFLP برای تمامی نمونه‌ها انجام و در آخر جهت بررسی وضعیت ژنوتیپی افراد از نظر وجود پلی مورفیسم هضم آنزیمی انجام شد. جهت تأیید داده‌ها تعدادی از نمونه‌های DNA توالی‌یابی شدند.

کلمات کلیدی: بیماری مولتیپل اسکلروز، خود ایمنی، بیماری MS

مقدمه

مولتیپل اسکلروز یا MS نوعی بیماری التهابی است که سیستم عصبی مرکزی را درگیر می‌کند (۱). در گذشته اطلاعات چندانی درباره این بیماری در دست نبود. در سال ۱۸۳۸ رابرت کارسول و ژان کروویلهیر آسیب وارده به نخاع را بیان کردند و در سال ۱۸۶۸ دکتر ژان مارتین شارکوت توانست افراد مبتلا به این بیماری را شناسایی کند. پس از آن‌ها آقای توماس ریورز در سال ۱۹۳۵ مشخص کرد که این بیماری در اثر نقص در سیستم ایمنی ایجاد می‌شود (۲). IL-13 پروتئینی با وزن ۱۳ کیلودالتون است و توسط ژنی که بر بازوی بلند کروموزوم ۵ قرار دارد کد می‌شود (۸). این پروتئین پس از اتصال به رسپتور IL-13R α 1 به رسپتور IL-4R α متصل شده و تشکیل رسپتور هتروداایمر را می‌دهند (۹). دمین سیتوپلاسمی رسپتور IL-13R α 1 و IL-4R α به ترتیب باعث فعال شدن تیروزین کیناز Tyk2/JAK2 و JAK1 می‌شوند (۱۰). این تیروزین کینازها خود باعث فسفریله و فعال شدن فاکتور رونویسی SATAT6 شده که در مرحله بعد دو مولکول فسفریله شده STAT6 تشکیل یک همودایمر را داده وارد هسته شده و منجر به رونویسی از ژن‌های مرتبط با IL-13 می‌گردند (۱۱). تا کنون پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی زیادی برای این ژن شناسایی شده است که باعث تغییر بیان ژن IL-13 و بروز بیماری‌های مختلف از جمله MS می‌شوند (۱۲). هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط بین سه پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی -1055C/T، -1112C/T و 1015A/C موجود در ناحیه پروموتوری ژن IL-13 با بروز بیماری MS در افراد بیمار شهر زنجان می‌باشد.

مبانی نظری

بیماری مولتیپل اسکلروزیس و تاریخچه آن

MS شایع‌ترین بیماری التهابی بوده که میلین‌های اطراف نورون‌های سیستم عصبی مرکزی یا (CNS)^۱ را درگیر می‌کند (۱). در سال ۱۸۳۸، MS به عنوان یک بیماری شناخته شد. رابرت کارسول و ژان کروویلهیر هر یک به طور مستقل آسیب وارده به نخاع را کشف کردند و پس از آن‌ها در سال ۱۸۶۸ آقای ژان مارتین شارکوت، پدر علم عصب شناسی مدرن، اولین کسی بود که نه تنها MS را به عنوان یک بیماری تشخیص داد بلکه راهی برای شناسایی افراد مبتلا به آن نیز ارائه کرد اما نتوانست راه درمانی مناسبی را برای آن پیدا کند.

علائم بیماری MS

MS یک بیماری خود ایمنی بوده و در اصل سیستم اعصاب مرکزی شامل مغز و نخاع را درگیر می‌کند. از لحاظ تاریخی، خستگی، اختلال شناختی، افسردگی و خلق و خوی نامناسب به عنوان علائم رایج بیماری MS شناخته شده بودند. حمام آب داغ ابتدایی‌ترین روش تشخیص MS بود. بدین طریق که فرد مشکوک به MS درون وانی از آب داغ قرار می‌گرفت و در صورت بدتر شدن علائم موجود در فرد، وجود بیماری MS مورد تأیید واقع می‌شد. این افراد دارای ناتوانایی جسمی و نقایصی در حرکت، حس و عملکرد شناختی می‌باشند (۱۵).

اشکال مختلف بیماری MS

به طور کلی بیماری MS به چهار دوره طبقه‌بندی می‌گردد. دوره عود و بهبود بیماری که تقریباً ۸۵ درصد از موارد MS را شامل می‌شود. سن وقوع آن بین ۲۰ تا ۴۵ سال بوده و در زنان نسبت به مردان بین ۲:۱ تا ۳:۱ رخ می‌دهد (زمانی که بیماری طی چند روز تا چند هفته عود کرده و مجدداً طی چند ماه تا چند سال به طور کامل یا ناقص بهبودی می‌یابد (RR)).^۲

فاکتورهای محیطی که باعث تشدید بیماری MS می‌شوند

فاکتورهایی که باعث آغاز حملات MS می‌شوند تقریباً نه همیشه فاکتورهای محیطی هستند نه ژنتیکی چراکه ساختار ژنتیکی فرد در هر زمان ثابت بوده و عوامل محیطی می‌توانند بر آن‌ها تأثیرگذار باشند و مشخص کنند که آیا MS در فردی

^۱ Central nervous system^۲ Relapsing-remitting MS

که از نظر ژنتیکی مستعد ابتلا به MS است بروز می‌کند یا خیر (۱۹).

بارداری

بر اساس مطالعات کاهش معناداری در میزان حملات MS در سه ماه اول و دوم بارداری و افزایش غیر معناداری در نرخ عود بیماری در طی سه ماه اول پس از زایمان دیده شده است. نرخ عود بیماری به طور معناداری تا حدود ۴۵ درصد در حین بارداری به خصوص طی سه ماهه سوم کاهش یافته و این میزان به طور چشمگیری تا حدود ۵۴ درصد در سه ماهه اول پس از زایمان-در برخی مطالعات دیگر- افزایش می‌یابد.

عفونت‌ها

احتمال تشدید MS در فردی که با سابقه سندرم عفونی مرتبط با روده یا سیستم تنفسی نسبت به زمانیکه فرد عاری از این عفونت‌ها است به طور معناداری افزایش می‌یابد (۱۹).

واکسیناسیون

برخی مطالعات نشان داده‌اند که واکسیناسیون نسبت به ویروس هپاتیت B و آنفولانزا می‌تواند در زمان بروز حملات MS تاثیرگذار باشد (۱۹، ۲۲).

فاکتورهای محیطی که باعث ایجاد بیماری MS می‌شوند

در ایجاد این بیماری اینتراکشن بین زمینه ژنتیکی فرد و شرایط محیطی که فرد در طول زندگی‌اش تجربه می‌کند، دخیل است.

ویروس اپشتاین بار (EBV)^۳

دو نظریه در رابطه با علت MS وجود دارد: نظریه بهداشت-فلج اطفال^۴ و نظریه شیوع^۵. بر اساس نظریه اول تماس یا عفونت ویروسی با عامل سببی در طی سال‌های اولیه دوران کودکی باعث محافظت بدن در برابر بیماری MS می‌شود اما تماس در بزرگسالی (پس از دوران کودکی) با همان عامل ویروس باعث بیماری می‌گردد. بر طبق نظریه دوم MS از طریق عامل پاتوژنی که در نواحی با فراوانی بالای MS وجود دارد، بیشتر اتفاق می‌افتد. ویروس‌های مختلفی شناخته شده‌اند که در بروز MS دخیل هستند اما شایع‌ترین و مهم‌ترین آن‌ها EBV است. تماس با EBV باعث عفونت مداوم سلول B و فعال شدن آن و نیز تکثیر آن‌ها می‌شود. از طرفی دیگر یک توالی پنج پپتیدی در آنتی ژن EBV وجود دارد که دارای همولوژی با اپیتوپ پروتئین اصلی میلین است. EBV همچنین باعث القاء بیان آلفا بی کریستالین^۶ می‌گردد. آلفا بی کریستالین یک جزء از آنتی ژن خودی است که در مغز بیماران MS به صورت اینرمال بیان می‌شود (۲۳).

کمبود ویتامین D

قرار گرفتن در معرض آفتاب و میزان ویتامین D فاکتورهای خطر مهمی هستند که بر میزان وقوع MS در مناطق جغرافیایی مختلف تاثیرگذار می‌باشند. شواهد نشان داده که هرچقدر میزان 25(OH)D که یک مارکر ویتامین D در سرم است در سرم افراد بیشتر باشد شیوع MS کمتر است (۱۸، ۲۴).

فاکتورهای ژنتیکی دخیل در بیماری MS

زمینه ژنتیکی فرد مهم‌ترین فاکتور خطر MS است. MS تنها ناشی از یک ژن نیست و چندین ژن در ایجاد آن دخیل هستند. در حالیکه بزرگترین عامل ژنتیکی مربوط به آنتی ژن لولوکسیت انسانی کلاس دو (HLA class II)^۷ است اما لوکوس دیگری مربوط به آنتی ژن لولوکسیت انسانی کلاس یک نیز به طور مستقل نیز تاثیرگذار است (۲۵). ال‌های HLA کلاس دو شامل DRB1*1501، DRB1*0301 و DRB1*1303 که در سلول‌های دخیل در ایمنی ذاتی بیان می‌شوند

³ Epstein-Barr virus

⁴ Poliomyelitis-hygiene hypothesis

⁵ Prevalence hypothesis

⁶ Alpha-B crystalline

⁷ Human leukocyte antigen class II

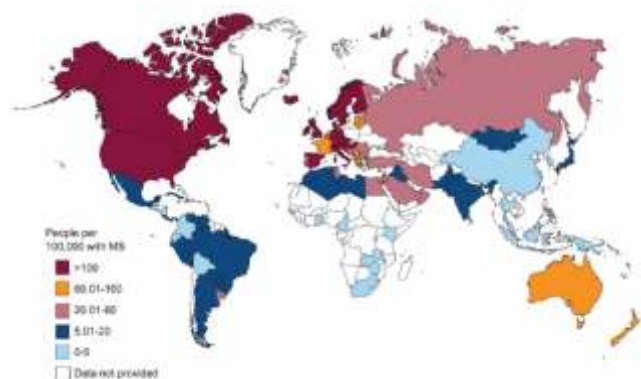
با ریسک افزایش یافته MS و ال‌های HLA کلاس یک HLA class I شامل A2 با ریسک کاهش یافته آن در ارتباط هستند.

جغرافیای بیماری MS

MS یک بیماری نسبتاً شایع در اروپا، ایالات متحده، کانادا، نیوزلند و بخش‌هایی از استرالیا می‌باشد. میزان بروز آن در دوران کودکی کم و بعد از سن ۱۸ سالگی به سرعت افزایش یافته و بین سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی به اوج خود می‌رسد (در زنان حدود دو سال زودتر از مردان رخ می‌دهد) و تقریباً ۳۵۰۰۰ نفر در آمریکا به آن مبتلا هستند. پس از آن شیوع بیماری به آرامی کاهش یافته و در افراد ۵۰ سال و بیشتر از ۵۰ سال کمتر دیده می‌شود. مطالعات نشان داده وقوع MS در زنان نسبت به مردان ۱/۵ تا ۲/۵ برابر است. زنان نسبت به مردان به MS حساس‌تر هستند به خصوص در طول ۳ ماه اول پس از زایمان (۱۶).

شیوع MS در سراسر جهان

در جمعیت‌های با خطر بالای MS، ریسک MS حدود ۱ در ۲۰۰ نفر زن و نسبت کمتری برای مردان است. MS در آسیا، مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شیوع بسیار کمتری دارد. در مناطق با آب و هوای معتدل میزان بروز MS با افزایش عرض جغرافیایی، هم در شمال و هم در جنوب خط استوا، افزایش می‌یابد (۲۹). در آمریکای شمالی و اروپای شمالی شیوع این بیماری ۶۰ تا ۲۰۰ نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است (۳). MS یک بیماری ناهمگن با پاتولوژی پیچیده بوده و عوامل اقتصادی و اجتماعی به طور قابل توجهی بر شیوع آن در سراسر جهان تاثیرگذار هستند. بر اساس گزارش سازمان جهانی (WHO)^۸ در سال ۲۰۱۳ دو میلیون و سیصد هزار نفر در سراسر جهان از MS رنج می‌برند (شکل ۱) (۳۰).



شکل ۱. شیوع MS در سراسر دنیا (۳۰)

شیوع MS در ایران

فرآیندهای پاتوفیزیولوژیک در MS به دوره بیماری و تظاهرات بالینی آن کمک می‌کنند بنابراین بیومارکرهایی که نشان‌دهنده وقوع این بیماری هستند، به صورت قابل توجهی امکان تشخیص، پیش‌بینی روند بیماری و بهینه‌سازی پاسخ‌های درمانی را فراهم می‌کنند. تصور می‌شود که ایران در منطقه کم خطر از نظر شیوع MS قرار داشته باشد. با این حال، مطالعات و تحقیقات اخیر در برخی از شهرها مانند اصفهان، حاکی از ریسک متوسط تا شدید بیماری MS است و از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر کمترین شیوع مربوط به شهر گلستان با ۱۸ نفر و بیشترین آن مربوط به اصفهان (۹۳/۶) می‌باشد (جدول ۱). همچنین کمبود ویتامین D و سیگار کشیدن ریسک ابتلا به MS را در بین ایرانیان افزایش می‌دهد. یکی از مهم‌ترین دلایل شیوع MS در ایران، سن جمعیت به عنوان یک عامل مهم است چرا که اکثریت جمعیت ایران در محدوده سنی ۱۵ تا ۳۰ سال قرار دارند و بیماری در جوانان بیشتر شایع می‌باشد.

شیوع MS در شمال غرب ایران در حد متوسط است. همچنین در تهران، بیماران مجرد در مقایسه با بیماران طلاق گرفته یا بیمارانی که همسر خود را از دست داده‌اند، به نظر می‌رسد در سطح بالاتری از نظر ابتلا به MS باشد (۴).

⁸ World Health Organization

جدول ۱. شیوع MS در شهرهای مختلف ایران تا سال ۲۰۱۴ (۴)

Cities in Iran	Prevalence of MS (n) Per 100000 Population
Isfahan	93.6
Charmahal and Bakhtiari	92.7
Fars	77.3
Tehran	74.3
Qom	50.4
Gilan	35.9
Zanjan	33.7
Golestan	18

نقش سیستم ایمنی ذاتی در MS

فاگوسیت‌های تک هسته‌ای مانند میکروگلیا و ماکروفاژها سلول‌های اصلی هستند که در بیماری MS در نقاط آسیب در هر دو فاز RR و پیشرفته بیماری حضور دارند (۳۱). این سلول‌ها با سلول‌های سیستم ایمنی اکتسابی مانند سلول‌های T و B واکنش می‌دهند اما با این وجود می‌توانند باعث التهاب عصبی در بافت آسیب دیده شوند. مثلاً فاگوسیت‌ها عمدتاً مسئول آسیب میلین و حذف آن و نیز آسیب آکسون بوده و تعداد این سلول‌ها به طور مثبتی با میزان آسیب آکسون در ارتباط است. ماکروفاژها و میکروگلیای فعال شده در بیماری MS منبع اصلی استرس اکسیداتیو، یک نوع مکانیسم آسیب است که به پاتولوژی جسم سفید و خاکستری در بیماری MS کمک می‌کند، هستند (۳۲).

نقش سیستم ایمنی اکتسابی در MS

پاتوژن‌ها در بافت‌هایی که با محیط خارج از بدن در تماس هستند مانند پوست، روده‌ها و ریه توسط سلول‌های دندریتیک پردازش می‌شوند. دندریتیک سل‌ها به گره‌های لنفاوی مهاجرت کرده و این آنتی ژن‌ها را به سلول‌های T ارائه می‌دهند. در گره‌های لنفاوی سلول‌های B نیز به عنوان سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن پس از دریافت آنتی‌ژن‌های محلول توسط رسپتورهای سلول B می‌توانند عمل کنند. در نتیجه اینتراکشن بین سلول‌های T و B در یک واکنش بدوی مرکزی (یک فرایند برنامه‌ریزی شده است که در آن سلول‌ها تکثیر شده، تحت جهش‌های سوماتیک زیادی قرار گرفته و نوترکیبی تغییر کلاس برای آن‌ها رخ می‌دهد) سلول‌های B تکثیر شده و به پلاسماسل‌های ترشح‌کننده آنتی‌بادی بالغ شده و به بافت مغز استخوان یا بافت التهاب دیده مهاجرت می‌کنند.

پروتئین IL-13

IL-13 دارای وزن مولکولی ۱۳ کیلودالتون (kDa) و چهار دسته‌ی مارپیچ آلفا (helix-alpha bundle) می‌باشد. لوکوس سایتوکین Th2 از لحاظ ساختاری بین گونه‌های مختلف حفظ شده و ژن‌های IL-4، IL-5 و IL-13 در نزدیکی یکدیگر و بر روی کروموزوم ۵ در انسان و ۱۱ در موش قرار دارند (۹). ژن IL-13 در انسان دارای ۴ اگزون و ۳ اینترون می‌باشد و پروتئین غیرگلیکوزیله‌ای را کد می‌کند که از ۱۳۲ اسید آمینه تشکیل شده است (۴۸).

مروری بر مطالعات و تحقیقات انجام شده

IL-13 در انسان توسط ژنی که بر بازوی بلند کروموزوم شماره ۵ قرار دارد، 5q31، کد می‌شود. طول این ژن ۲۹۳۸ جفت باز بوده و تاکنون چندین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) برای پروموتور این ژن و زیرواحدهای رسپتور آن شناسایی شده است که با بیماری‌های مختلفی در ارتباط هستند چرا که بر تنظیم عملکرد IL-13، مسیرهای انتقال پیام رسپتور IL-4/-13 و اتصال لیگاند به رسپتور و در نتیجه احتمال ابتلا به بیماری‌ها و التهاب اثرگذار هستند (۵۷). برای مثال پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs20541 (در اگزون شماره ۴ و موقعیت باز ۱۳۰ ژن IL-13) و rs1800925 (در ناحیه مجاور انتهای ۵' ژن IL-13) قرار دارند و به ترتیب باعث تغییر باز G به A و باز C به T می‌گردند. این SNP‌ها فعال شدن STAT6 و مسیرهای انتقال پیام درون سلولی آن را نیز طولانی‌تر می‌کنند (۵۸). در مطالعه‌ای مروری ارتباط بین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی +1923C/T (rs1295686) موجود در اینترون سوم و احتمال ابتلا به آسم را پس از بررسی ۲۶ کار تحقیقاتی انجام شده بر ۱۷۶۴۲ فرد بیمار (مبتلا به آسم) و ۴۲۴۰۲ فرد سالم به عنوان گروه کنترل گزارش شد. نتایج بررسی نشان داد

هر سه ژنوتیپ TT، CT و CC با ریسک افزایش یافته آسم و افزایش میزان IgE در سرم افراد بیمار در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری در ارتباط است (۴۸). در مطالعه‌ای مکانیسمی که طی آن این واریانت ممکن است منجر به آسم شود مورد بررسی قرار گرفته است. پژوهشگران پس از انجام این مطالعات دریافتند که واریانت IL13Q130 نسبت به نوع وحشی آن باعث مقاومت افزایش یافته شده و ممکن است ناشی از میل اتصال بالایی این واریانت به رسپتور IL-13R α 2 باشد (۵۱).

در مطالعه‌ای که توسط خانم سیفی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی ۶۸ فرد مبتلا به MS که در مراحل اولیه آن بودند (RRMS) و مقایسه آن‌ها با ۱۱۰ فرد سالم انجام شد، ارتباط بین سه پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی IL-13 شامل C-1112T، A-1512C و G+2044A با میزان خطر ابتلا به MS بررسی شد. نتایج نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های CC، AA و نیز آلل‌های C، C و A در SNP‌های به ترتیب C-1112T، A-1512C و G+2044A در افراد بیمار نسبت به افراد سالم بالاتر می‌باشد. همچنین ارتباط معنی داری بین آلل C-1112T و سن شروع بیماری MS مشاهده شد. بر طبق این مطالعه بین SNP‌های مورد مطالعه IK-13 و میزان حساسیت و ابتلا به MS در جمعیت بیمار مورد مطالعه ایرانی ارتباط معنی داری وجود داشت (۵۹). در مطالعه‌ای دیگر ارتباط بین دو پلی مورفیسم 590C>T و 1112C>T - که به ترتیب در ژن IL-4 و IL-13 قرار دارند با دیابت تیپ ۲ (Type 2 diabetes mellitus) بررسی شد. در این مطالعه ۱۳۵ فرد مبتلا به دیابت تیپ ۲ و ۷۵ فرد سالم به عنوان گروه که افراد هر دو گروه از مصر بودند کنترل حضور داشتند. نتایج نشان داد فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت CC IL-4-590 (۱۰/۴٪) و CC IL-13-1112 (۲۰/۷٪) در افراد بیمار نسبت به افراد سالم (۴۳/۴۸٪ و ۵۶/۸٪) کمتر است اما فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت CT IL-4-590 (۸۲/۲٪) و CT IL-13-1112 (۷۶/۳٪) در این افراد بیشتر از گروه سالم (۴۷/۸٪ و ۴۱/۳٪) می‌باشد و هر دو پلی مورفیسم با توارث دیابت تیپ دو به طور معنی داری در ارتباط هستند. زمانی که در این مطالعه فاکتورهای جنسیت، سابقه خانوادگی بیماری و قومیت نیز در نظر گرفته شد تفاوت معنی داری در نتایج به چشم نخورد (۶۰).

با این وجود برای تعیین نقش دقیق SNP‌ها در جلوگیری یا ابتلا به MS باید مطالعات بیشتری بر روی دیگر SNP‌های IL-13 و نیز پلی مورفیسم‌های مربوط به رسپتور IL-13 و سایر سیتوکین‌ها انجام شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به ترتیب شامل مراحل زیر است:

- جمع‌آوری نمونه خون محیطی
- استخراج DNA با استفاده از کیت
- طراحی پرایمرها
- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز
- هضم آنزیمی
- توالی‌یابی

طرز تهیه محلول‌های مورد نیاز

جهت استخراج DNA و الکتروفورز به محلول‌های زیر نیاز است:

طرز ساخت محلول TAE (50X)

محلولی است که داخل تانک الکتروفورز ریخته می‌شود تا میدان الکتریکی را به جریان بباندازد. DNA تحت تاثیر قدرت یونی بافر در ژل حرکت می‌کند. بافر الکتروفورز انواع مختلف دارد. از جمله بافر حاوی تریس، استیک اسید و EDTA (TAE)^۹ و نیز بافر حاوی تریس، فسفات و EDTA (TBE)^{۱۰}. بافرهای الکتروفورز در محلول‌های غلیظ ساخته می‌شوند و در دمای اتاق ذخیره می‌گردند. به طور معمول از بافر TAE برای الکتروفورز ژل آگارز استفاده می‌شود.

^۹ Tris base/Acetic acid/EDTA buffer

^{۱۰} Tris base/Borate/EDTA buffer

جهت تهیه بافر TAE X50، ابتدا ۲۴۲ گرم پودر تریس بیس وزن و به میزان ۴۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه شد و با استفاده از مگنت و دستگاه استیرر^{۱۱} پودر در آن حل گردید. پس از آن که محلول شفاف شد، مقدار ۵۷/۱ میلی‌لیتر گلاسیال استیک اسید به آن اضافه شد. این کار به وسیله دستگاه پیپتور در زیر هود شیمیایی انجام شد. سپس مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر EDTA ۰/۵ مولار به آن اضافه و سپس به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از آن جایی که بافر مورد استفاده در الکتروفورز و همچنین ساختن ژل آگارز TAE 1X است، محلول تهیه شده برای استفاده به عنوان بافر الکتروفورز لازم می‌بود که ۵۰ بار رقیق شود.

طرز ساخت بافر لودکننده

از این بافر برای سنگین کردن DNA جهت لود کردن آن در داخل چاهک‌ها و ردیابی آن در میدان الکتروفورز استفاده می‌شود. برای ساخت آن ۰/۰۲۵ گرم برموفنل بلو، ۱۵ میلی لیتر گلیسرول و ۵۰ میلی لیتر DDW با هم مخلوط گردید و در دمای اتاق نگهداری شد.

تهیه نمونه‌های مورد مطالعه

در این مطالعه از روش مورد-شاهد استفاده شد. افراد مورد نظر شامل ۳۰ فرد مبتلا به بیماری MS به عنوان گروه مورد که بیماری آن‌ها توسط پزشک تأیید شده بود و ۳۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد بودند. میانگین سن افراد بیمار ۳۴ و به بیمارستان ولیعصر شهر زنجان ارجاع داده شده بودند. همچنین میانگین سن افراد سالم ۴۸ سال بود.

نمونه‌گیری

از هر فرد ۳ سی سی خون گرفته و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد. نمونه‌های خون در یخچال ۴°C (برای استفاده سریع) و یا در فریزر دمای ۲۰°C- (برای استفاده پس از چند روز) نگهداری و بعد توسط ظروف عایق حرارت حاوی یخ به آزمایشگاه ژنتیک منتقل شدند. اطلاعات تکمیلی در پاسخ‌نامه‌ها قرار گرفت و رضایت‌نامه از بیماران گرفته شد.

استخراج DNA از خون

استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت GeneAll® Exgene™ Blood SV mini انجام شد. خونی که فریز شده جهت استفاده باید به سرعت در حمام آب ۳۷°C از حالت انجماد خارج و تا قبل از استفاده بر روی یخ نگهداری شود.

مراحل استخراج DNA

۱- ۲۰ µl از محلول پروتئیناز K (که در غلظت ۲۰ mg/ml درون کیت موجود است) در انتهای یک لوله سانتریفیوژ ۱ ml ۱/۵ پیپت می‌شود. چنانچه حجم نمونه بیشتر از ۲۰۰ µl باشد، مقدار پروتئیناز K با نسبت مناسبی افزایش می‌یابد. چنانچه تعداد سلول‌ها کم باشد، تا مقدار ۴۰۰ µl از نمونه را می‌توان استفاده کرد و برای این مقدار از نمونه ۴۰ µl از محلول پروتئیناز K نیاز است.

۲- ۲۰۰ µl از نمونه را به لوله حاوی محلول پروتئیناز K منتقل می‌شود. اگر حجم نمونه کمتر از ۲۰۰ µl باشد، با استفاده از 1X PBS حجم نهایی به ۲۰۰ µl رسانده می‌شود. چنانچه به DNA فاقد RNA نیاز باشد، ۲۰ µl از محلول RNase (در غلظت ۲۰ mg/ml درون کیت موجود است) به نمونه اضافه و جهت مخلوط شدن با نمونه ۲ الی ۳ بار پیپتاژ شده و در دمای اتاق برای ۲ دقیقه انکوبه می‌شود. چنانچه به نمونه محلول RNase A اضافه نشود، RNA همراه DNA استخراج شده و واکنش‌های آنزیمی پایین دست را مهار می‌کند.

۳- ۲۰۰ µl از بافر BL به لوله مرحله ۳ اضافه و به طور کامل ورتکس شده تا مخلوط شوند. سپس محلول حاصل را در دمای ۵۶°C برای ۱۰ دقیقه انکوبه و برای یکی شدن قطرات چسبیده به جداره لوله با محلول انتهای لوله، به طور مختصر اسپین می‌شود. چنانچه حجم نمونه بیشتر از ۲۰۰ µl باشد، مقدار بافر BL اضافه شده به همان نسبت باید افزایش یابد. نسبت بافر BL به نمونه خون اولیه ۱:۱ می‌باشد. جهت حصول نتیجه خوب مخلوط کردن بافر BL با مخلوط درون لوله ضروری است.

^{۱۱} Stirrer

انکوباسیون بیشتر از ۱۰ دقیقه هیچ اثری بر بهبود کیفیت DNA استخراج شده ندارد.

۴- $200 \mu\text{l}$ از اتانول مطلق به نمونه (مرحله ۴) اضافه و ورتکس شده تا به طور کامل با محلول درون لوله مخلوط شود. سپس برای یکی شدن قطرات چسبیده به جداره لوله با محلول انتهایی لوله، به طور مختصر اسپین می‌شود. چنانچه حجم نمونه بیشتر از $200 \mu\text{l}$ باشد، مقدار اتانول مطلق اضافه شده متناسب افزایش می‌یابد.

۵- مخلوط حاصل از مرحله ۵ با دقت به یک ستون SV منتقل و برای ۱ دقیقه در دور $6000 \times g$ ($>8000 \text{ rpm}$) سانتریفیوژ می‌شود. سپس لوله جمع‌آوری دور انداخته شده و یک لوله جمع‌آوری جدید استفاده می‌شود. چنانچه حجم نمونه اولیه بیشتر از $200 \mu\text{l}$ باشد، این مرحله دوباره تکرار می‌شود. همچنین اگر مخلوط به طور کامل از فیلتر درون ستون SV عبور نکرد، تا زمانی که کل محلول از آن خارج شود سانتریفیوژ مجدد در دور بالای $13000 \times g$ (با سرعت کامل) انجام خواهد شد. سانتریفیوژ در این دور بر بهبود کیفیت DNA اثری ندارد.

۶- $600 \mu\text{l}$ از بافر BW به ستون SV اضافه و برای ۱ دقیقه و در دور $6000 \times g$ ($>8000 \text{ rpm}$) سانتریفیوژ و بعد لوله جمع‌آوری تعویض می‌شود. چنانچه پس از سانتریفیوژ در ستون SV نقاط رنگی مشاهده شد تا زمان ناپدید شدن رنگ این مرحله باید تکرار شود. سانتریفیوژ در این دور بر بهبود کیفیت DNA اثری ندارد.

۷- $700 \mu\text{l}$ از بافر TW به ستون اضافه و برای ۱ دقیقه در دور $6000 \times g$ ($>8000 \text{ rpm}$) سانتریفیوژ می‌شود. محتویات دورن لوله جمع‌آوری را دور ریخته و ستون SV مجدد درون آن گذاشته می‌شود.

۸- جهت خارج شدن باقیمانده بافر شستشو سانتریفیوژ در دور $6000 \times g$ برای ۱ دقیقه انجام و ستون SV درون یک تیوب $1/5 \text{ ml}$ تازه منتقل می‌شود.

۹- $200 \mu\text{l}$ از بافر AE یا آب استریل به نمونه اضافه و برای ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌شود. سپس در دور کامل برای ۱ دقیقه سانتریفیوژ می‌گردد.

ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده

جهت انجام PCR مناسب باید غلظت و کیفیت DNA در حد مطلوب باشد. لذا از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز استفاده شد.

روش اسپکتروفتومتری

برای بررسی مقدار DNA و میزان خلوص آن از نظر آلودگی به اسیدهای نوکلئیک و پروتئین از دستگاه نانوفتومتر^{۱۲} استفاده شد. برای اینکه دستگاه Blank شود ابتدا ۱ لاند آب مقطر در محل مورد نظر در دستگاه گذاشته شد و بعد ۱ لاند از DNA استخراج شده روی سطح پایه دستگاه (محل مورد نظر جهت قرارگیری نمونه) قرار داده شد. جذب در طول موج 260 nm به تنهایی بیانگر غلظت DNA استخراج شده است. اگر OD^{260} مقدار ۱ بدست آید یعنی حدود $50 \mu\text{g/ml}$ از DNA موجود است. سپس نسبت جذب DNA در 260 nm نانومتر به جذب DNA در 280 nm نانومتر خوانده شد تا خلوص DNA بررسی گردد که این نسبت برای DNA می‌بایست بین $1.8-2.0$ باشد. در صورتیکه نسبت جذب بدست آمده کمتر از این مقدار باشد نشان‌دهنده آلودگی DNA به پروتئین و فنل و اگر بیشتر از مقدار ذکر شده باشد به معنی آلودگی DNA به RNA می‌باشد.

روش الکتروفورز

برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز و ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. حجم ژل آگارز، با توجه به اندازه تانک الکتروفورز تعیین می‌شود. در این مطالعه ۱ گرم پودر آگارز وزن و با ۱۰۰ سی سی از بافر TAE 1X (که از رقیق‌سازی بافر 1X TAE بدست آمده) در بشر مخلوط شد. بشر حاوی مخلوط روی هیتز مغناطیسی قرار گرفت و یک مگنت درون آن انداخته شد تا به خوبی آگارز در بافر حل شود. پس از شفاف شدن محتویات، بشر از روی هیتز برداشته شد تا کمی خنک شود و مگنت به کمک آهن ربا خارج شد. مقدار مناسبی از رنگ فنل بلو به بشر اضافه شد. سینی ژل در داخل

¹² Nanodrop Spectrophotometer

¹³ Optical Density

تانک الکتروفورز قرار داده و شانه به منظور ایجاد چاهک‌هایی در ژل داخل سینی در شیار مربوطه نزدیک قطب منفی قرار داده شد. سپس مقدار مشخصی از محلول آگارز پس از کمی خنک شدن به آرامی در داخل سینی پلاستیکی ریخته شد به طوری که ضخامت ژل بین ۳ تا ۲ میلی متر شود. بایستی دقت شود که در این مرحله حباب هوا در ژل ایجاد نشود. پس از ۲۰ دقیقه که ژل بسته شد، شانه به آرامی از داخل ژل بیرون آورده شد و نگهدارندها از دو انتهای سینی خارج شدند. پس از قرارگیری ژل درون تانک، بافر 1X TAE در داخل تانک الکتروفورز ریخته شد بطوریکه حدود یک میلی متر روی سطح ژل را بپوشاند. ۵ μl از DNA با ۱ μl از بافر لودکننده مخلوط شده و درون چاهک‌ها بارگذاری گردید تانک الکتروفورز به منبع تغذیه متصل و الکتروفورز با ولتاژ 90 ولت به مدت 30 دقیقه صورت گرفت. ژل از تانک خارج شد و جهت عکسبرداری در دستگاه Gel Documentation قرار گرفت.

PCP

بیش از ۲۷ میلیون SNP در ژنوم انسان وجود دارد که اطلاعات مربوط به آن‌ها در سایت NCBI موجود است (۶۱). PCR تکنیکی ارزان، ساده و دقیق برای بررسی SNP‌ها می‌باشد. برای بررسی پلی‌مورفیسم‌های مورد نظر در پروموتور ژن IL-13 از روش PCR استفاده و در آخر نمونه‌ها برای توالی‌یابی فرستاده شد. واکنش PCR همیشه با طراحی یک جفت پرایمر مناسب که نقاط SNP را در محصولات PCR شناسایی کنند آغاز می‌شود. جفت پرایمرهای به کار رفته در واکنش PCR باید طوری انتخاب شوند که تنها ناحیه مورد نظر از DNA تکثیر شود (۶۲).

خصوصیات پرایمر مناسب

- ۱- طول پرایمرها باید بین ۱۵ تا ۳۰ نوکلئوتید باشد.
- ۲- محتوی بهینه GC باید بین ۴۰ تا ۶۰ درصد باشد.
- ۳- انتهای ۳' پرایمرها باید دارای یک باز G یا C باشد تا پرایمر به طور محکم به رشته الگو متصل بماند. چراکه سه پیوند هیدروژنی بین باز G و C باعث محکمتر شدن این اتصال می‌شود.
- ۴- انتهای ۳' پرایمر بالادست و پایین دست نباید مکمل هم باشند. همچنین در داخل خود پرایمرها نباید توالی مکمل وجود داشته باشد در غیر اینصورت باعث تشکیل ساختارهای ثانویه شامل دایمر پرایمر و ساختارهای سنجاق سری می‌شود.
- ۵- دمای ذوب مناسب برای پرایمرها (T_m)^{۱۴} از ۵۲ درجه سانتی‌گراد تا ۵۸ درجه سانتی‌گراد متفاوت است و این رنج می‌تواند بین ۴۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد نیز در مواردی تغییر کند اختلاف بین دمای ذوب پرایمر بالادست و پایین دست باید حدود ۵ درجه سانتی‌گراد باشد.
- ۶- از وجود تکرارهای دو نوکلئوتیدی مانند GCGCGCGC یا ATATATAT یا تک بازی مانند CCCCCC یا AAAAAA در طول پرایمر باید جلوگیری شود چرا که این تکرارها ممکن است باعث رخ دادن سر خوردن در طول قطعه در حال سنتز DNA و یا ایجاد ساختارهای سنجاق سری شوند. در صورت عدم امکان جلوگیری از حضور این تکرارها به دلیل چیدمان طبیعی DNA الگو تعداد این بازهای تکراری می‌بایست ۴ باز باشد (۶۲).
- ۷- دمای اتصال (T_a)^{۱۵} که برای PCR انتخاب می‌شود به طور مستقیم به طول و ترکیب ساختاری پرایمرها بستگی دارد. این دما نباید بیشتر از ۵ درجه سانتی‌گراد زیر دمای ذوب پرایمرها باشد. یکی از پیامدهای پایین بودن بیش از حد دمای اتصال باعث اتصال پرایمرها به نقاطی غیر از توالی هدف و در نتیجه تکثیر غیر اختصاصی DNA در واکنش PCR می‌شود (۶۳).

طراحی پرایمر

پرایمرها با استفاده از نرم افزار Primer3 و Oligo7 طراحی شدند. پس از طراحی پرایمرها، برای اطمینان از اینکه پرایمر طراحی شده فقط قطعه مورد نظر را تکثیر می‌کند، پرایمرهای منتخب با نرم افزار Blast مورد بررسی قرار گرفتند (۶۴). برای تهیه غلظت استوک پرایمرها بر اساس پروتکل شرکت ... میکرولیتر آب مقطر به پرایمرها اضافه و به آرامی پیپتاژ شدند تا یکنواخت گردند و به غلظت ۱۰۰ pmol/ μl برسند. برای تهیه غلظت کاربردی پرایمرها (غلظت ۱۰ pmol/ μl) مقدار ۹

¹⁴ Melting temperature

¹⁵ Annealing temperature

میکرولیتر آب مقطر استریل به ۱ میکرولیتر از استوک تهیه شده اضافه شد (جدول ۲).

جدول ۲. مشخصات پرایمر طراحی شده

نام ژن	توالی پرایمر	محتوای GC پرایمر	طول پرایمر (bp)	طول محصول (bp)	دمای ذوب پرایمر
IL13	۵' - ۳'		۶۷۰		
IL-13	۵' - ۳'		۶۷۰		

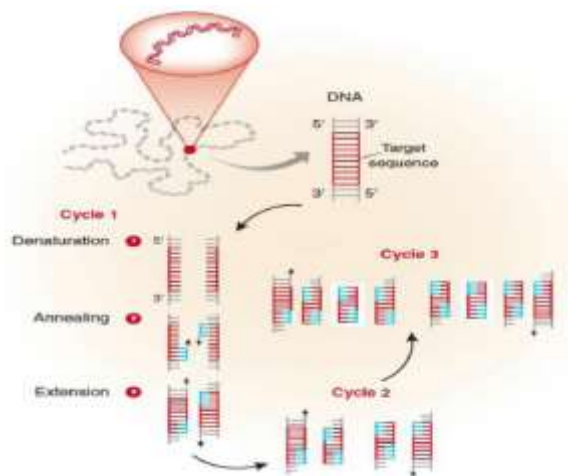
واکنش زنجیره ای پلی مراز یا PCR

PCR روشی آنزیمی و ساده است که امکان افزایش تعداد یک قطعه خاصی از DNA را بین تعداد بسیار زیادی قطعات DNA فراهم می کند. این تکنیک در سال ۱۹۹۰ توسط دکتر کری مولیس^{۱۶} برای اولین بار کشف شد. واکنش PCR طی سه مرحله اساسی اتفاق می افتد و در هر بار تکرار شدن این سه مرحله تعداد مولکول DNA دو برابر می شود (شکل ۲):

- ۱- فرایند واسرشت^{۱۷} که محلول واکنش تحت دمایی بالاتر از نقطه ذوب دو رشته مکمل DNA قرار می گیرد تا دو رشته از هم جدا شوند.

- ۲- فرایند هیبریداسیون^{۱۸} یا اتصال که در آن دما کاهش می یابد تا جفت پرایمرهای خاص طراحی شده به قطعات DNA الگو متصل شوند.

- ۳- فرایند بسط^{۱۹} که دما مجدداً افزایش می یابد تا آنزیم DNA پلی مراز بتواند با اضافه کردن نوکلئوتیدها به پرایمرها، رشته DNA را بسط دهد (۶۵).



شکل ۲. شکل شماتیک واکنش PCR

مراحل انجام واکنش PCR

مخلوط واکنش PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر تهیه شد (جدول ۳) ۳۰ سیکل تکثیر بعد از دناتوره شدن اولیه DNA در دمای ۹۵ °C برای ۳ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر رخ داد. هر سیکل شامل یک مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C برای ۶۰ ثانیه، یک مرحله اتصال که دمای آن وابسته به دمای ذوب جفت پرایمرها دارد برای ۳۰ ثانیه و یک مرحله بسط در دمای ۷۲ °C برای ۶۰ ثانیه بود. یک مرحله بسط نهایی نیز در دمای ۷۲ °C برای ۸ دقیقه به عنوان سیکل آخر انجام شد

¹⁶ Dr. Kary Mullis

¹⁷ Denaturation

¹⁸ Hybridization

¹⁹ Extension

(جدول ۴). برای جلوگیری از آلودگی باید از وسایل استریل و دستکش استفاده شود. تمامی مراحل روی یخ صورت پذیرفت و به منظور تشخیص آلودگی یک میکروتیوب به عنوان کنترل منفی استفاده شد بدین صورت که در داخل آن تمامی مواد ذکر شده در جدول ریخته شد ولی به جای نمونه DNA هم حجم آن آب مقطر اضافه شد. نهایتاً برای تأیید محصول PCR و اطمینان از عدم هر گونه آلودگی از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

جدول ۳. مواد لازم برای تهیه محلول واکنش PCR

غلظت نهایی	غلظت مصرفی	نام ترکیب
1X	۲/۵ µl	10X PCR Buffer
۱-۱/۵ mmol	۰/۷۵ µl	MgCl ₂
۰/۲ mmol	۰/۵ µl	Dntp
۰/۲ pM	۰/۵ µl	Forward Primer
۰/۲ pM	۰/۵ µl	Reverse Primer
۰/۰۶ unit/µl	۰/۳ µl	Taq DNA Polymerase Enzyme
-	۱۰ µl	dH ₂ O
۱/۶ ng	۴ µl	Template DNA

جدول ۴. برنامه دمایی PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر

تعداد سیکل	زمان	دما	مرحله واکنش
۱	۳ دقیقه	۹۵ °C	دناتوراسیون اولیه
۳۰	۱ دقیقه	۹۵ °C	دناتوراسیون
	۳۰ ثانیه	۶۲ °C	اتصال
	۱ دقیقه	۷۲ °C	بسط
۱	۸ دقیقه	۷۲ °C	بسط نهایی
۱	۱۰ دقیقه	۴ °C	توقف کار دستگاه

توالی‌یابی DNA^{۲۰}

به طور کلی عبارت توالی‌یابی به روش‌هایی اطلاق می‌شود که در آن ترتیب بازهای نوکلئوتید A، T، C و G در یک مولکول DNA را مشخص می‌کند. در حال حاضر یکی از روش‌های پر طرفدار در شناسایی SNPها تعیین توالی مستقیم DNA است. محصول PCR هر نمونه درون ویالی که با برچسب حاوی اطلاعات مربوط به شماره نمونه‌ی مورد نظر مشخص شده، ریخته شد. در فرم مخصوص تعیین توالی نیز اطلاعات مربوط به پرایمر مورد نظر، طول محصول حاصل از آن و غلظت محصول PCR وارد شد. نمونه‌ها به همراه فرم مربوطه برای خوتنش توالی محصولات PCR به شرکت قرستاده شد. تعیین توالی با استفاده از دستگاه ABI3100 انجام و نتایج توسط نرم افزار Finch TV خوانده شد.

اهداف تحقیق

- اهداف علمی: شناسایی ارتباط جهش‌ها (سه پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی -1055C/T، -1112C/T و 1015A/C

²⁰ Sequencing

مربوط به ژن IL-13 با بروز بیماری MS

- اهداف کاربردی: ۱- تشخیص افراد ناقل این جهش‌ها، ۲- جلوگیری از انتقال این جهش‌ها به نسل بعد ۳- جلوگیری از تظاهر فنوتیپ دارای جهش (تظاهر بیماری) در افراد ناقل ال دارای جهش

اهمیت تحقیق

علی رغم اینکه بیماری MS یک بیماری ژنتیک است اما فاکتورهای محیطی نیز در بروز آن دخیل بوده و شرایط اقلیمی نیز می‌توانند میزان بروز آن را تحت تاثیر قرار دهند. وجود پلی مورفیسم‌ها نیز بر بروز بیماری اثرگذار می‌باشد. در مطالعاتی که قبلاً انجام شده در کشورهای مختلف و پیرامون برخی پلی مورفیسم‌های ژن IL-13 و ارتباط آن‌ها با بیماری‌های مختلف مانند بیماری‌های اتوپیک پرداخته شده است. در این مطالعه سعی بر آن است که ارتباط بین سه پلی مورفیسم -1055C/T، -1112C/T و 1015A/C منطقه پروموتری ژن IL-13 در بیماران مبتلا به MS ساکن شهر زنجان (ایران) بررسی و با گروه کنترل مقایسه شود.

فرضیات و سوالات پژوهشی

- پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی -1055C/T منطقه پروموتری ژن IL-13 با ابتلا به بیماری MS در ارتباط است.
- پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی -1112C/T منطقه پروموتری ژن IL-13 با ابتلا به بیماری MS در ارتباط است.
- پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی 1015A/C منطقه پروموتری ژن IL-13 با ابتلا به بیماری MS در ارتباط است.
آیا سه پلی مورفیسم -1055C/T، -1112C/T و 1015A/C واقع در ناحیه پروموتری ژن IL-13 با ابتلا به بیماری MS در ارتباط هستند؟

بحث و نتیجه گیری

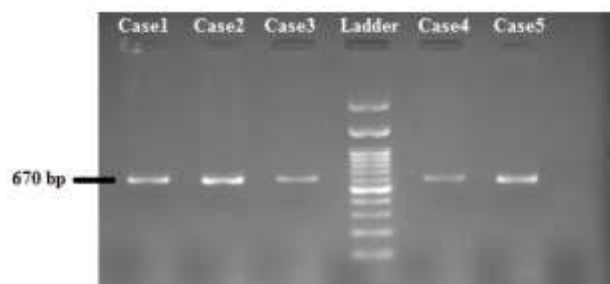
خصوصیات گروه بیماران

در این مطالعه ۳۰ بیمار که فازهای مختلف بیماری MS قرار داشتند مورد مطالعه قرار گرفتند که ۸ نفر آن‌ها مرد و ۲۲ نفر زن بودند (جدول ۵). میانگین سنی افراد بیمار ۳۴ سال بود. در گروه کنترل نیز ۱۵ مرد و ۱۵ زن قرار گرفتند. میانگین سنی افراد گروه کنترل نیز ۴۸ سال بود.

جدول ۵. رنج سنی افراد بیمار در مطالعه

سن	۲۰-۳۰	۳۰-۴۰	۴۰-۵۰	۵۰-۷۰
تعداد افراد بیمار	۶	۹	۱۲	۳

نتایج استخراج DNA



شکل ۳. تصویری از ژل الکتروفورز DNA استخراج شده با استفاده از نمونه‌های بیمار (اندازه قطعه مورد نظر

۶۷۰bp و ژل الکتروفورز ۱٪ و مارکر مولکولی ۱۰۰۰bp)

بررسی نتایج حاصل از تعیین توالی پس از آنالیز آماری

طول قطعه ای که با استفاده از این جفت پرایمر برای SNP مورد نظر پس از واکنش PCR بدست می‌آید ۶۷۰ جفت باز است. تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Finch TV و سایت NCBI استفاده شد. جهت بررسی تعادل هاردی-واینبرگ از برنامه Snp analyser و به صورت آنلاین استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. طبق

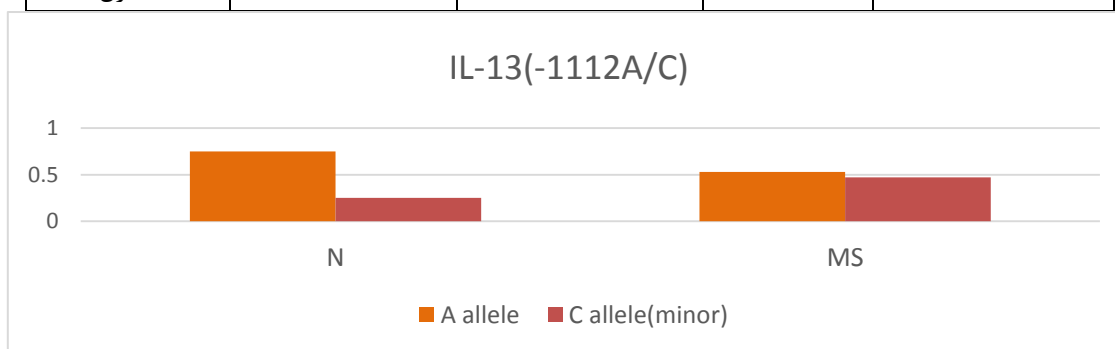
نتایج بدست آمده در مورد پلی مورفیسم A-1112C جمعیت بیماران MS و کل جامعه مورد مطالعه در تعادل هاردی-واینبرگ هستند. در مورد پلی مورفیسم C-1510A نیز جامعه بیماران MS و کل جامعه در تعادل هاردی-واینبرگ می باشند.

فراوانی الی IL-13-1112A>C

در پلی مورفیسم A-1112C فراوانی ال C در افراد مبتلا به MS، ۰/۴۷ و در گروه کنترل ۰/۲۵ بوده است. با توجه به $P=0/001$ از نظر آماری معنی دار بوده و با توجه به $OR=3/43$ که بالای ۱ است نشان دهنده این مطلب است که ال C در این موقعیت می تواند ریسک ابتلا به MS را افزایش دهد (جدول ۶) (نمودار ۱).

جدول ۶. توزیع فراوانی الی IL-13-1112A>C در دو گروه

گروه (N=۶۰)	فراوانی ال		P-value	OR (CI 90%)
	ال A (N=۷۲)	ال C (مینور) (N=۴۸)		
MS	۰/۵۳(۳۲)	۰/۴۷(۲۸)	۰/۰۰۱	۳/۴۳(۱/۶-۷/۴)
کنترل	۰/۷۵(۴۴)	۰/۲۵(۱۶)		



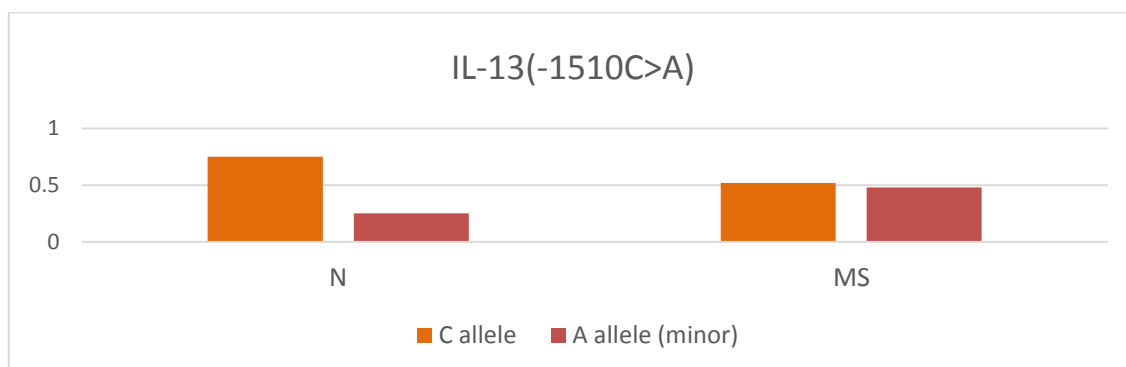
نمودار ۱. مقایسه ی ال های 1112A/C- در دو گروه بیمار و کنترل

فراوانی الی IL-13-1510C>A

در پلی مورفیسم C-1510A فراوانی ال A در افراد مبتلا به MS ۰/۴۸ و در افراد نرمال ۰/۲۵ بود که طبق $P=0/003$ از نظر آماری معنی دار بوده و وجود ال A در این موقعیت می تواند ریسک ابتلا به MS را افزایش دهد (جدول ۷) (نمودار ۲).

جدول ۷. توزیع فراوانی الی IL-13-1510C>A در دو گروه

گروه (N=۶۰)	فراوانی ال		P-value	OR (CI 90%)
	ال C (N=۷۴)	ال A (مینور) (N=۴۶)		
MS (۳۰)	۰/۵۲(۳۲)	۰/۴۸(۲۸)	۰/۰۰۳	۳/۲۰(۱/۵-۶/۹)
کنترل (۳۰)	۰/۷۵(۴۴)	۰/۲۵(۱۶)		



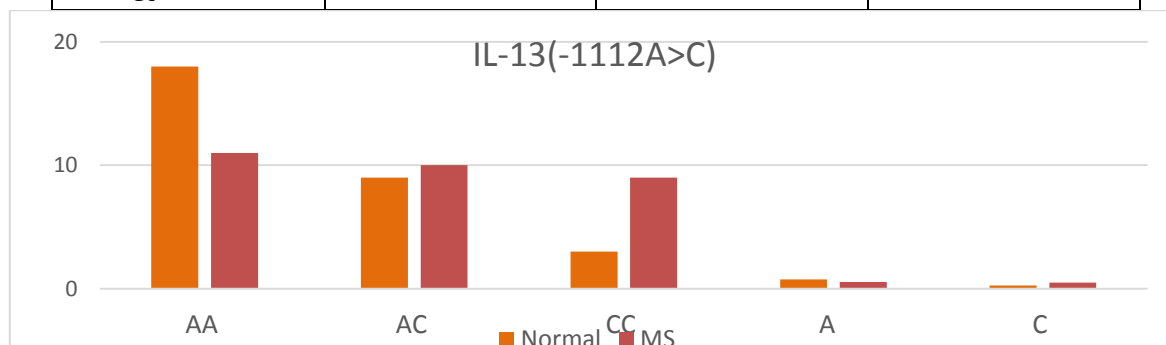
نمودار ۲. مقایسه ی الل های 1510C/A- در دو گروه بیمار و کنترل

توزیع فراوانی ژنوتیپی الل IL-13 -1112A>C

در گروه بیمار از بین ۳۰ نفر، ۱۱ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (AA)، ۱۹ نفر ژنوتیپ هتروزیگوت (AC) و ۹ نفر ژنوتیپ هموزیگوت دارای پلی مورفیسم (CC) بودند. در گروه کنترل فراوانی هر یک از سه ژنوتیپ به ترتیب ۱۸، ۹ و ۳ نفر مشاهده شد (جدول ۸) (نمودار ۳).

جدول ۸. توزیع فراوانی ژنوتیپ های الل 1112A>C- در دو گروه

گروه	فراوانی ژنوتیپ		
	CC (N=۱۴)	AC (N=۱۹)	AA (N=۲۷)
MS (۳۰)	۶/۵ (N=۹)	۱۴/۹ (N=۱۰)	۸ (N=۱۱)
کنترل (۳۰)	۱/۹ (N=۳)	۱۱/۲ (N=۹)	۱۶/۹ (N=۱۸)



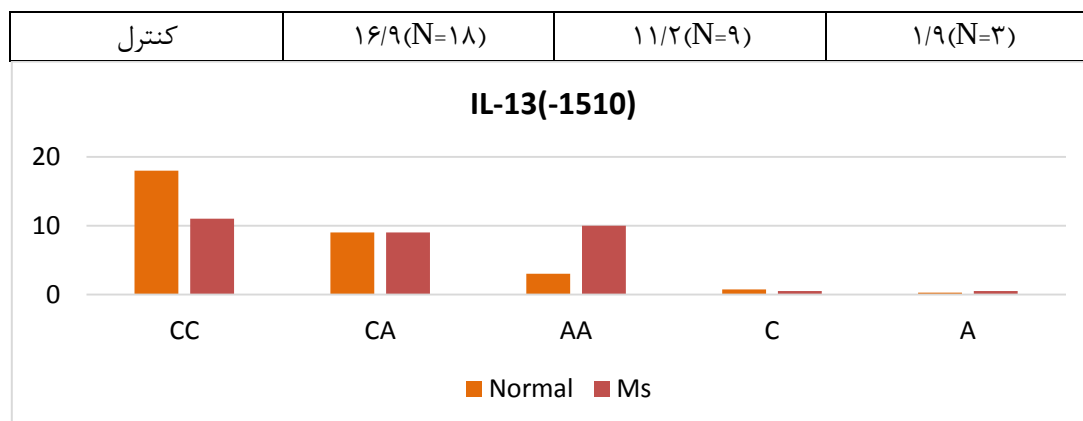
نمودار ۳. مقایسه ژنوتیپ های الل 1112A>c- در دو گروه

توزیع فراوانی ژنوتیپی الل IL-13 -1510C>A

در گروه بیمار از بین ۳۰ نفر، ۱۱ نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (AA)، ۱۹ نفر ژنوتیپ هتروزیگوت (CA) و ۹ نفر ژنوتیپ هموزیگوت دارای پلی مورفیسم (CC) بودند. در گروه کنترل فراوانی هر یک از سه ژنوتیپ به ترتیب ۱۰، ۹ و ۳ نفر (۱۸) مشاهده شد (جدول ۹) (نمودار ۴).

جدول ۹. توزیع فراوانی ژنوتیپ های الل 1510C>A- در دو گروه

گروه	فراوانی ژنوتیپ		
	CC (N=۲۸)	CA (N=۱۸)	AA (N=۱۴)
MS	۸ (N=۱۱)	۱۵ (N=۹)	۷ (N=۱۰)

نمودار ۴. مقایسه ژنوتیپ‌های $A > C-1510$ در دو گروه

فراوانی هاپلوتایپ‌ها در جمعیت مورد مطالعه

با آنالیز هاپلوتایپ‌ها مشخص گردید که فراوانی h_1 در جمعیت $0/6$ و h_2 $0/38$ بوده است. با توجه به مقدار P و OR بدست آمده، هاپلوتایپ $AC (h_1)$ که $OR=0/292$ است یک هاپلوتایپ محافظت کننده در برابر MS می تواند باشد و $CA (h_2)$ با توجه به $OR=3/207$ می تواند به عنوان ریسک فاکتور مستعد کننده MS مطرح شود (جدول ۱۰).

جدول ۱۰. توزیع هاپلوتایپ دو پلی مورفیسم مورد نظر در جمعیت

هاپلوتایپ	فراوانی	X^2	P -value	OR
AC (h_1)	۰/۶	۱۰/۱۰۸	۰/۰۰۱	۰/۲۹۲ (۰/۱۳۵-۰/۶۳۲)
CA (h_2)	۰/۳۸	۹/۰۲۵	۰/۰۰۳	۳/۲۰۷ (۱/۴۸-۶/۹۴)

منابع

1. Bendszus M, Storch-Hagenlocher B. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. Inflammatory Diseases of the Brain: Springer; 2013. p. 3-18.
2. T Jock Murray M. Multiple sclerosis: the history of a disease: Demos medical publishing; 2004.
3. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. Annu Rev Immunol. 2005;23:683-747.
4. Sahebi R, Amiri M, Jami MS. Multiple Sclerosis in Iran. International Journal of Epidemiologic Research. 2017;5(1):30-
5. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. Brain. 2006;129(3):606-16.
6. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. The Lancet Neurology. 2015;14(4):406-19.
7. Mirshafiey A, Jadidi-Niaragh F. Prostaglandins in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. Immunopharmacology and immunotoxicology. 2010;32(4):543-54.
8. Fiedler SE, George JD, Love HN, Kim E, Spain R, Bourdette D, et al. Analysis of IL-6, IL-1 β and TNF- α production in monocytes isolated from multiple sclerosis patients treated with disease modifying drugs. Journal of systems and integrative neuroscience. 2017;3(3).

9. Gilmour J, Lavender P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells. *Immunology*. 20۰۴-۴۳۷:(۴)۱۲۴;۰۸
10. Vandenbroeck K. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions: CRC Press; 2006.
11. Hönzke S. In vitro Skin Disease Equivalents and their Applications in Basic Dermatologic Research. 2018.
12. Benveniste EN, Liu Y, McFarland BC, Qin H. Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2014;34(8):۵۷۷-۵۸۸
13. Kantarci OH, Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Neurologic clinics*. 2005;23(1):17-38.
14. Murry T. The history of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis: Diagnosis, Medical Management, and Rehabilitation*. 2000:1-35.
15. Rejdak K, Jackson S, Giovannoni G. Multiple sclerosis: a practical overview for clinicians. *British medical bulletin*. 2010;95(1):79-104.
16. Koriem KMM. Multiple sclerosis: New insights and trends. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6(5):42۰-۴۲۹
17. Pinheiro MAL, Kooij G, Mizze MR, Kamermans A, Enzmann G, Lyck R, et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2۰۲۱-۴۶۱:(۳)۱۸۶۲;۰۱۶
18. Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Pluchino S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Progress in neurobiology*. 2015;127:1-22.
19. Goodin DS. The pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2015;6:2-22.
20. Voskuhl R, Momtazee C. Pregnancy: Effect on Multiple Sclerosis, Treatment Considerations, and Breastfeeding. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2017;14(4):974-84.
21. Airas L, Kaaja R. Pregnancy and multiple sclerosis. *Obstetric medicine*. 2012;5(3):94-7.
22. Langer-Gould A, Qian L, Tartof SY, Brara SM, Jacobsen SJ, Beaber BE, et al. Vaccines and the risk of multiple sclerosis and other central nervous system demyelinating diseases. *JAMA neurology*. 2014;71(12):1506-13.
23. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(5):A387-A9.
24. Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2004;199(7):971-9.
25. 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.
26. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple

- sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214.
27. 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.
 28. Compston A, McDonald I, Noseworthy J, Lassmann H, Miller D, Smith K, et al. *McAlpine's multiple sclerosis* 2006.
 29. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology*. 2007;61(4):288-99.
 30. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014;83(11):1022-4.
 31. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature medicine*. 2005;11(3):328.
 32. Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H. Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain*. 2017;140(7):1900-13.
 33. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*. 1996;85(3):299-302.
 34. Sospedra M, Martin R, editors. *Immunology of multiple sclerosis*. Seminars in neurology; 2016: Thieme Medical Publishers.
 35. Grigoriadis N, Van Pesch V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European journal of neurology*. 2015;22:3-13.
 36. Baranzini SE. Revealing the genetic basis of multiple sclerosis: are we there yet? *Current opinion in genetics & development*. 2011;21(3):317-24.
 37. Goodin SLHDS. Multiple Sclerosis and Other Demyelinating Diseases In: Dan L. Longo E, Anthony S. Fauci, Editor, Dennis L. Kasper, Editor, Stephen L. Hauser, Editor, J. Larry Jameson, Editor, Joseph Loscalzo, Editor, editor. *Harrison's Principles of Internal Medicine*.
 38. Longo DL. Daniel S. Reich, MD, Ph. D., Claudia F. Lucchinetti, MD, and Peter A. Calabresi, MD. *N Engl J Med*. 2018;378:169-80.
 39. Salou M, Nicol B, Garcia A, Laplaud D-A. Involvement of CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Frontiers in immunology*. 2015;6:604.
 40. Milo R. Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(7):714-8.
 41. Rossi S, Mancino R, Bergami A, Mori F, Castelli M, De Chiara V, et al. Potential role of IL-13 in neuroprotection and cortical excitability regulation in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2011;17(11):1301-12.
 42. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis. *CNS drugs*. 2011;25(6):491-502.
 43. Mahon B, Gordon S, Cruz J, Cosman F, Cantorna M. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *Journal of neuroimmunology*. 2003;134(1-2):128-32.
 44. Veroni C, Serafini B, Rosicarelli B, Fagnani C, Aloisi F. Transcriptional profile and

- Epstein-Barr virus infection status of laser-cut immune infiltrates from the brain of patients with progressive multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*. 2018;15.۱۸:(۱)
45. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2014;10(4):225.
 46. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung H-P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3(4):291.
 47. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(9):545.
 48. Xu Y, Li J, Ding Z, Li J, Li B, Yu Z, et al. Association between IL-13+ 19 α C/T polymorphism and asthma risk: a meta-analysis based on 26 case-control studies. *Bioscience reports*. 2017:BSR20160505.
 49. Gandhi NA, Pirozzi G, Graham NM. Commonality of the IL-4/IL-13 pathway in atopic diseases. *Expert review of clinical immunology*. ۳۷-۴۲۵:(۵)۱۳;۲۰۱۷ .
 50. Renauld J-C. New insights into the role of cytokines in asthma. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(8):577-89.
 51. Hershey GKK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. ۹۰-۶۷۷:(۴)۱۱۱;۲۰۰۳ .
 52. Doran E, Cai F, Holweg CT, Wong K, Brumm J, Arron JR. Interleukin-13 in asthma and other eosinophilic disorders. *Frontiers in medicine*. 2017;4:139.
 53. Sheikh F, Dickensheets H, Pedras-Vasconcelos J, Ramalingam T, Helming L, Gordon S, et al. The interleukin-13 receptor- α 1 chain is essential for induction of the alternative macrophage activation pathway by IL-13 but not IL-4. *Journal of innate immunity*. 2015;7(5):494-505.
 54. Suzuki A, Leland P, Joshi BH, Puri RK. Targeting of IL ۴-and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine*. 2015;75(1):79-88.
 55. Lupardus PJ, Birnbaum ME, Garcia KC. Molecular basis for shared cytokine recognition revealed in the structure of an unusually high affinity complex between IL-13 and IL-13R α 2. *Structure*. 2010;18(3):332-42.
 56. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annual review of immunology*. 2003;21(1):425-56.
 57. McCormick SM, Heller NM. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*. 2015;75(1):38-50.
 58. Deng Y, Xie M, Xie L, Wang J, Li T, He Y, et al. Association between polymorphism of the interleukin-13 gene and susceptibility to hepatocellular carcinoma in the Chinese population. *PloS one*. 2015;10(2):e0116682.
 59. Seyfizadeh N, Kazemi T, Farhoudi M, Aliparasti MR, Sadeghi-Bazargani H, Almasi S, et al. Association of IL-13 single nucleotide polymorphisms in Iranian patients to multiple sclerosis. *American journal of clinical and experimental immunology*. 2014;3(3):124.
 60. Alsaid A, El-Missiry M, Hatata E-S, Tarabay M, Settin A. Association of IL-4-590 C> T and IL-13-1112 C> T gene polymorphisms with the susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Disease markers*. 2013;35(4):243-7.

61. Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature protocols*. 2007;2(11):2857.
62. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012(63):.
63. Sipos R, Székely AJ, Palatinszky M, Révész S, Márialigeti K, Nikolausz M. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007;60(2):341-50.
64. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. 2012;13(1):134.
65. Garibyan L, Avashia N. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(3):e6.