Original Article

Association of rs2232365 polymorphism in promoter of FOXP3 gene with the incidence of rheumatoid arthritis in Iranian population

Nasimeh Mahmoodi (M.Sc), M.Sc in Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6813-9189

***Maryam Peymani (Ph.D)**, **Corresponding Author**, Assistance Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. **peymani62_m@yahoo.com** ORCID ID: 0000-0001-5075-5661

Seyed Morteza Javadirad (Ph.D), Assistance Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2891-2293

Abstract

Background and Objective: Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic inflammatory disease. The FOXP3 gene is an agent that activates during the course of the disease and accumulates in the sinus arthritis of the inflamed joints, resulting in persistent inflammation and ultimately tissue damage. Regarding the role of polymorphism in promoter regions in gene expression, this study was conducted to determine the association of rs2232365 polymorphism in promoter of FOXP3 gene with the incidence of rheumatoid arthritis in Iranian population.

Methods: In this case-control study, in order to investigate the relationship between FOXP3 gene rs2232365 polymorphism and rheumatoid arthritis, 77 patients and 67 healthy subjects were evaluated. The genotype of individuals for polymorphism rs2232365 was determined by PCR-RFLP method.

Results: The highest genotypic frequency was related to CC genotype with 89% frequency in two healthy and diseased populations and no difference was observed in genotypic and allelic abundance in healthy and patient populations. Different genotypes of this polymorphism did not have a significant relation with the risk of RA, while it had a significant correlation with the level of CCP factor and CC genotype was associated with the progression of RA disease by increasing the level of CCP ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed that there is no correlation between polymorphism rs2232365 in promoter of FOXP3 gene with Rheumatoid arthritis in Iranian population.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Polymorphism, rs2232365, FOXP3 gene, Iran

Received 4 Apr 2018 **Revised** 26 Aug 2018 **Accepted** 6 Oct 2018

Cite this article as: Nasimeh Mahmoodi, Maryam Peymani, Seyed Morteza Javadirad. [Association of rs2232365 polymorphism in promoter of FOXP3 gene with the incidence of rheumatoid arthritis in Iranian population]. J Gorgan Univ Med Sci. 2019 Autumn; 21(3): 88-93. [Article in Persian]

تحقیقی

ارتباط پلی‌مورفیسم rs2232365 در پروموتر ژن FOXP3 با بروز بیماری آرتریت روماتوئید در جمعیت ایرانی

نسیمه محمودی، کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. ORCID ID: 0000-0001-6813-9189
*** دکتر مریم پیمانی**، استادیار ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. ORCID ID: 0000-0001-5075-5661
دکتر سید مرتضی جوادی راد، استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. ORCID ID: 0000-0002-2891-2293

چکیده

زمینه و هدف: *آرتریت روماتوئید (rheumatoid arthritis: RA) شایع‌ترین بیماری التهابی سیستمیک مفاصل است. محصول ژن FOXP3 عاملی است که در روند بیماری فعال شده و در سینوویوم مفاصل ملتهب تجمع می‌یابند و در نتیجه سبب تداوم التهاب و در نهایت آسیب بافتی می‌گردند. با توجه به نقش چندشکلی‌های ناحیه پروموتری در بیان ژن‌ها، این مطالعه به منظور تعیین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی C924T (rs2232365) در پروموتر ژن FOXP3 با خطر ابتلا به آرتریت روماتوئید انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه مورد - شاهدی به منظور بررسی ارتباط چندشکلی rs2232365 ژن FOXP3 با خطر ابتلا به روماتیسم مفصلی، ۷۷ فرد بیمار و ٦٧ فرد سالم بررسی شدند. ژنوتیپ افراد برای چندشکلی rs2232365 با روش PCR-RFLP تعیین شد.*

یافته ها: *بیشترین فراوانی ژنوتیپی مربوط به ژنوتیپ CC با فراوانی ۸۹ درصد در دو جمعیت سالم و بیمار بود و تفاوتی در فراوانی ژنوتیپی و آللی در دو جمعیت سالم و بیمار مشاهده نگردید. ژنوتیپ‌های مختلف این چندشکلی با خطر ابتلا به بروز بیماری RA ارتباط آماری معنی‌داری نداشت. در حالی‌که با سطح عامل CCP ارتباط آماری معنی‌داری داشت و ژنوتیپ CC با پیشرفت بیماری RA از طریق افزایش دادن سطح CCP در ارتباط بود (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که بین پلی‌مورفیسم rs2232365 در پروموتر ژن FOXP3 با بروز بیماری آرتریت روماتوئید در جمعیت ایرانی ارتباطی وجود ندارد.*

کلید واژه‌ها: *آرتریت روماتوئید ، چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی ، rs2232365 ، ژن FOXP3*

* نویسنده مسؤول : دکتر مریم پیمانی ، پست الکترونیکی peymani62_m@yahoo.com
نشانی: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تلفن ۳۳۳۶۱۰۱۰-۰۳۸
وصول مقاله: ۱۳۹۷/۱/۱۵ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/٦/٤ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۷/۱٤

مقدمه

آرتریت روماتوئید (rheumatoid arthritis: RA) بیماری سیستمیک مزمنی است که حدود یک درصد جمعیت دنیا به آن مبتلا می شوند (۱). شیوع RA در زنان ۳-۲/۵ برابر بیشتر از مردان است (۲). ایجاد بیماری‌های خود ایمنی از جمله RA بستگی به تعامل عوامل ژنتیکی و محیطی دارد. ۵۰ درصد از علت وقوع RA وابسته به ژنتیک است (۳). در سایر موارد عوامل محیطی را عامل بیماری دانسته‌اند. در بسیاری از موارد خودایمنی رخ نمی‌دهد؛ مگر این که یک حادثه اضافه مانند عامل محیطی، باعث افزایش بیان استعداد به بیماری شوند (۴). در مفاصل ملتهب جمعیت هتروژنی از سلول‌ها و مدیاتورهای محلول سیستم ایمنی مانند ماکروفاژها، لنفوسیت‌های B، Tو سایتوکاین‌ها تجمع می‌یابند. لازم به ذکر است که یکی از دلایل اصلی برای این بیماری وجود سلول های T کمکی ۱۷ (Th17) است که در روند بیماری فعال شده و در سینویوم مفاصل ملتهب تجمع می‌یابند و در نتیجه سبب تداوم التهاب و در نهایت آسیب بافتی می گردد. Th17 از طریق اینترلوکین ۱۷ (IL17) نقش خود را ایفا می کند (۵). اینترلوکین۱۷ با القای تولید TNF-α، IL-1β و IL-6 در سلول های اپیتلیال، اندوتلیال و نیز انواع سلول‌های دیگری همچون کراتینوسیت‌ها، سینوویوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و ماکروفاژها باعث تقویت پاسخ های التهابی می شوند (۶). سلول های T تنظیمی انواعی از سلول‌های ایمنی بدن هستند که در متوقف کردن فعالیت Th1 یا Th2 و یا هر دو دخالت دارند و توسط بیان دایمی زنجیره آلفای گیرنده اینترلوکین ۲ (CD25) شناخته می شوند (۷). سلول‌های Treg زیر مجموعه‌ی مشخص از سلول‌های T هستند که می توانند پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی را مهار کنند (۸). FOXP3 عضو خانواده عامل نسخه برداری fokhead winged- helix ، به عنوان عامل شاخص رده و عامل توسعه و همچنین حفظ فعالیت مهاری سلول های Treg است که به‌طور اختصاصی در سلول‌های TCD4+CD25high بیان می‌شود (۹). دسته ای از سلول های Treg وجود دارند که از تیموس مشتق

نشده‌اند و در محیط قابلیت تولید دایم FOXP3 را کسب می‌نمایند. این سلول‌ها در انسان منبع عمده سلول‌های Treg را تشکیل می‌دهند (۱۰). FOXP3 بر روی کروموزوم X واقع شده است. FOXP3 برای اختصاصیت و حفظ سلول های Treg ضروری است. بنابراین به عنوان یک تنظیم‌گر اصلی تلقی می‌شود. همچنین جهش‌های فقدان عملکرد آن، منجر به اختلال التهابی و خودایمنی چند عضوی شدید (IPEX) در انسان می‌گردد (۱۰). از عناصری که بر بیان ژن FOXP3 دخالت دارند؛ می‌توان microRNA ها را نام برد که باعث تغییرات پس از رونویسی و کنترل بیان ژن می‌شوند (۱۱). در این ژن حدوداً ۲۰ جهش‌یافته است که می‌توان به جهش IPEX اشاره کرد. این جهش تاکنون ناشناخته مانده و وابسته به کروموزوم X است. این جهش به‌صورت مغلوب وجود دارد و علایم این جهش در زمان زایمان و یا اوایل دوران کودکی شروع می شود. در زنان چنین بیماری تاکنون گزارش نشده و اگر زنان ناقل چنین جهشی باشند؛ در آنها هیچ علایمی دیده نمی شود (۱۲). از دو چندشکلی رایج این ژن می‌توان (rs3761548) C/A 3279 و (rs2232365) A/G 924 را نام برد که در مناطق پروموتری این ژن مشاهده شده و می توانند بیان این ژن را تحت تاثیر قرار دهند. این چندشکلی‌ها با استعداد ابتلا به بیماری‌های مختلف در ارتباط هستند (۱۳). با توجه به جستجوی انجام شده، مطالعه‌ای در مورد ارتباط چندشکلی rs2232365 در پروموتر ژن FOXP3 و بیماری RA انجام نشده بود. لذا این مطالعه به منظور تعیین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی C924T (rs2232365) در پروموتر ژن FOXP3 با خطر ابتلا به آرتریت روماتوئید انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه مورد – شاهدی بر روی ۷۷ فرد بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید (۶۲ زن و ۱۵ مرد) و ۶۷ فرد سالم (۴۴ زن و ۲۳ مرد) در سال ۱۳۹۵ انجام شد. جمعیت بیمار مراجعین به واحد نمونه گیری آزمایشگاه‌های مهدیه و برادران و بیمارستان امیرالمومنین اصفهان به‌صورت تصادفی ساده انتخاب شدند. گروه سالم از بین مراجعه‌کنندگانی که فاقد هر گونه سابقه بیماری خاصی بودند؛ به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. از آزمودنی‌ها رضایت‌نامه کتبی شرکت آگاهانه در مطالعه اخذ شد.

بیماری مبتلایان به RA توسط پزشک متخصص روماتولوژی تایید گردید. عوامل موثر در این بیماری به نام RF و CCP (بر اساس نتایج آزمایش ها) نیز مورد بررسی قرار گرفته بود که این اطلاعات برای تعدادی از افراد بیمار مراجعه کننده در دسترس قرار گرفت.

معیارهای ورود به مطالعه شامل داوطلب بودن برای شرکت در مطالعه و در گروه مورد، ابتلا به آرتریت روماتوئید متوسط تا شدید براساس معیارهای بین‌المللی (۱۴) و در گروه شاهد شامل عدم ابتلا به آرتریت روماتوئید و سایر بیماری های خودایمن بودند. معیار عدم ورود به مطالعه شامل عدم تمایل به ادامه مشارکت در مطالعه بود.

در ابتدا سن و جنس افراد گروه بیمار مشخص شد و سپس یک نفر شاهد به ازای بیمارانی با اختلاف ±۵ سال انتخاب گردید. سپس DNA ژنومی از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در لوله‌های CBC حاوی EDTA، با روش میلر (Salting out) استخراج و DNA استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایش PCR فریز گردید (۱۵).

فاکتور روماتوئیدی اتو آنتی‌بادی‌هایی از جنس ایمونوگلوبولین نوع IgM هستند که در سیستم ایمنی خود فرد ایجاد می شوند. این آنتی‌بادی‌ها در حالت طبیعی برای دفاع بدنی در مقابل عفونت‌ها هستند؛ ولی در بیماری‌های التهابی هم چون آرتریت روماتوئید یا همان روماتیسم دردهای مفصلی را ایجاد می‌کنند. این اتو آنتی‌بادی‌ها با حمله اشتباه به بافت‌های طبیعی بدن زمینه‌ساز دردهای مفصلی می گردند. آزمایش فاکتور روماتوئیدی (RF) ممکن است زمانی انجام شود که فرد علایم و نشانه‌های بیماری آرتریت روماتوئید را داشته باشد. سطح بالاتر فاکتور روماتوئیدی با شدت بیماری رابطه مستقیم دارد؛ اما نتیجه منفی آزمایش RF وجود آرتریت روماتوئید را رد نمی کند (۱۴). مقادیر RF کمتر یا مساوی ۲۰ IU/ml به‌عنوان موارد طبیعی و مقادیر بیش از ۲۰ IU/ml به‌عنوان موارد غیرطبیعی در نظر گرفته شد. یکی از تست‌های با ارزشی که اهمیت زیادی در تشخیص زودرس RA دارد؛ آنتی‌بادی‌های ضدپپتیدهای حلقوی سیترولینه (Anti CCP) است. انجام این تست به روش الایزا انجام می شود که در این صورت ۹۸ درصد Specificity در سرم خون بیماران با RA قطعی و ۹۶درصد اختصاصیت در سرم خون بیماران با شروع علایم کمتر از یک سال مشخص می‌شود (۱۴).

تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش PCR-RFLP صورت گرفت. برای طراحی توالی پرایمر، ابتدا با مراجعه به سایت NCBI (National Central For Biotechnology Information) توالی ژن FOXP3 به دست آمد و با استفاده از نرم‌افزار Oligo-7 یک جفت پرایمر رفت و برگشت برای چندشکلی rs2232365 که دربرگیرنده ناحیه پروموتری ژن موردنظر بود؛ طراحی گردید. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بهینه‌سازی شد. توالی پرایمر رفت '5-TGCGCCGGGCTTCATCGACA-3' و توالی پرایمر برگشت '5-CTGAGACTTTGGGACCGTAG-3' بود. مواد لازم برای انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر DNA ژنومی، ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس 2X (Ampliqon)، از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (۵ pmol) یک میکرولیتر، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی بودند.

مراحل انجام آزمایش به ترتیب زیر بر روی نمونه های گروه بیمار و شاهد انجام شد.

پس از دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA برای چندشکلی rs2232365 در ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۰/۵ دقیقه، ۶۷ درجه سانتی‌گراد ۰/۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۰/۵ دقیقه) تکثیر یافتند و در مرحله نهایی، طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. صحت انجام واکنش پلیمراز بر روی ژل آگارز یک درصد تایید شد. RFLP بر روی محصول PCR برای چندشکلی rs2232365 توسط آنزیم BseNI مطابق دستور شرکت تولیدکننده آنزیم انجام گردید. مواد لازم برای تیمار با آنزیم موردنظر در حجم ۱۶میکرولیتر شامل ۹ میکرولیتر آب مقطر، یک میکرولیتر بافر B، یک میکرولیتر آنزیم محصول (Thermo Scientific ساخت ژاپن) و ۵ میکرولیتر محصول PCR بود. سپس قطعات حاصل از RFLP بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و قطعات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل مشاهده گردید. به منظور مقایسه فراوانی آللی و ژنتیکی بین دو گروه بیمار و سالم و با توجه به کوچک بودن حجم نمونه های مورد مطالعه در هر گروه، تحلیل داده‌های به دست آمده از تیمار آنزیمی با آزمون دقیق فیشر انجام گردید. سطح معنی‌داری آزمون آماری کمتر از ۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-24 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

محدوده سنی گروه مورد ۸۱-۲۱ سال و گروه شاهد ۸۱-۱۶ سال بود. میانگین سنی گروه مورد ۱۲/۵۲±۵۱/۷۹ سال و گروه شاهد ۱۴/۳۳±۴۸/۵ سال بود. بین گروه مورد و شاهد تفاوت آماری معنی داری از نظر سن و جنس وجود نداشت و گروه ها همسان بودند.

اطلاعات RF و CCP همه بیماران در دسترس نبود و به‌عنوان missing در آنالیز داده ها در نظر گرفته شد. در گروه مورد میانگین و انحراف معیار دامنه RF ۱۰۸/۶۴±۱۲۰/۹ و دامنه CCP ۱۷۷/۹۷±۱۷۸/۶۲ تعیین شد.

پس از تکثیر DNA نمونه‌های جمع‌آوری شده و مشاهده محصول ۳۸۸ جفت باز (شکل یک)، محصولات PCR برای تعیین ژنوتیپ هر یک از نمونه‌ها تحت آنالیز با RFLP قرارگرفتند. نتایج به‌دست آمده از آنالیز با روش PCR-RFLP بوسیله آنزیم BseNI در حضور آلل T دو باند ۱۲۷ و ۲۶۱ جفت‌بازی و در حضور آلل C سه باند ۷۷، ۱۲۷ و ۱۸۴ جفت‌بازی ایجاد می‌شود که نتایج هضم آنزیمی در شکل ۲ قابل مشاهده است.

Codominant شامل CC، CT و TT در گروه مورد به ترتیب شامل ۶۹ و ۸ و صفر و در گروه شاهد به ترتیب شامل ۶۰، ۶ و ۱ تعیین شد. بررسی توزیع فراوانی آللی در دو گروه بیمار و سالم بر اساس جدول یک نشان داد که آلل T به عنوان آلل خطر در هر دو گروه مورد (۵/۱۹ درصد) و شاهد (۵/۹ درصد) دارای کمترین فراوانی است. همچنین فراوانی آللی در دو گروه بیمار و سالم دارای تفاوت آماری معنی‌داری نبود.

جدول ۱ : توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در دو گروه مبتلا به بیماری آرتریت روماتوئید و سالم

rs2232365		مورد (n=۷۷) تعداد (درصد)	شاهد (n=٦٧) تعداد (درصد)
Dominant	CC	٦٨ (٨٩/٥)	٦٠ (٨٦/٦)
	CT+TT	٨ (١٠/٥)	٧ (١٠/٤)
Allele	C	١٤٦ (٩٤/٨١)	١٢ (٩٤/١)
	T	٨ (٥/١٩)	٨ (٥/٩)

فراوانی ژنوتیپ های CC و CT+TT بر اساس جدول یک در گروه بیمار به ترتیب ۸۹/۶ درصد و ۱۰/۴ درصد و در گروه سالم به ترتیب ۸۹/۵ درصد و ۱۰/۵ درصد تعیین شد و فراوانی ژنوتیپ ها در دو گروه مورد و شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌داری نبود.

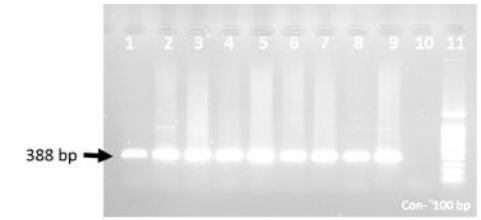
توزیع فراوانی ژنوتیپی در دو گروه مردان سالم و بیمار نشان داد که ژنوتیپ CC در هردو گروه سالم (۸۰ درصد) و بیمار (۸۶ درصد) دارای بیشترین فراوانی است. فراوانی ژنوتیپی در این دو گروه دارای تفاوت آماری معنی دار نبود. نتایج به دست آمده از ارزیابی شانس ابتلا به RA در زنان نیز بیانگر وجود نتایج مشابه بود و نتایج نشان داد که ژنوتیپ CC در هردو گروه (به ترتیب ۹۰ درصد و ۹۲ درصد) دارای بیشترین فراوانی است. فراوانی ژنوتیپی در این دو گروه تفاوت آماری معنی داری نشان نداد. توزیع فراوانی ژنوتیپی در دو گروه مردان و زنان در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ : توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها براساس ویژگی‌های باتوفیزیولوژی در دو گروه مبتلا به بیماری آرتریت روماتوئید و سالم

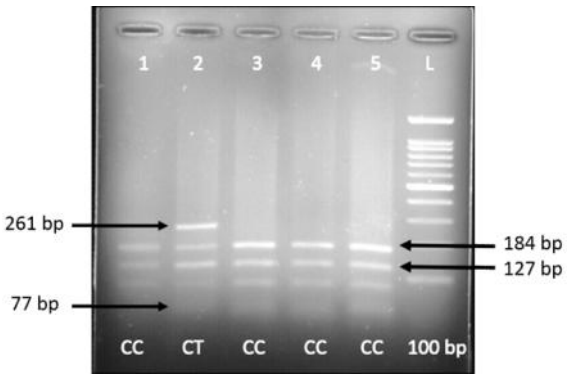
متغیرها		rs2232365 C > T genotype CC	rs2232365 C > T genotype CT + TT	p-value
CCP	≤30	۳۸	۳	۰/۰۰۸
	>30	۸	۲	
RF	≤20	٤٣	۲	۱
	>20	٦	۰	
زنان (n=١٠٦)	مورد	٥٧	٥	۱
	شاهد	٤٠	٤	
مردان (n=٣٨)	مورد	١٢	٣	۰/٦٦٣
	شاهد	٢٠	٣	

با توجه به جدول ۲، در ارتباط با پارامتر RF، ژنوتیپ CC در هر دو گروه RF≤20 و RF>20 دارای بیشترین فراوانی (به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۸۷ درصد) بود. فراوانی ژنوتیپی در این دو گروه دارای تفاوت آماری معنی دار نبود. در ارتباط با پارامتر CCP نیز بررسی مشابهی انجام شد و در ارتباط با پارامتر CCP، ژنوتیپ CC در هر دو گروه CCP≤30 و CCP>30 نیز دارای بیشترین فراوانی

(به ترتیب ۶۸ درصد و ۱۰۰ درصد) بود. فراوانی ژنوتیپی در این دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۸). از طرفی توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها به‌صورت کیفی نشان داد که شانس افزایش CCP به بالای عدد ۳۰ در افراد مبتلا به RA با ژنوتیپ CC در مقایسه با افراد بیمار با سایر ژنوتیپ‌ها افزایش یافته است.



شکل ۱ : الکتروفورز محصولات PCR چاهک‌های ۹-۱ نمونه‌های تکثیریافته و چاهک ۱۰ کنترل منفی و کنش است. مارکر از نوع bp ۱۰۰ است.



شکل ۲ : ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs2232365 توسط روش PCR-RFLP در چاهک شماره ۱ ، ۳ ، ٤ و ٥ ژنوتیپ CC مشاهده می‌شود که قطعاتی با اندازه bp ۱۸٤، ۷۷، ۱۲۷ را دارا است. چاهک شماره ۲ نمونه ژنوتیپ CT را نشان می‌دهد که دارای قطعاتی با اندازه bp ۷۷، ۱۲۷، ۱۸٤ و ۲٦۱ است.

بحث

در این مطالعه به بررسی ارتباط ژنوتیپ های مختلف چندشکلی rs2232365 در ژن FOXP3 با بروز بیماری RA پرداخته شد و نتایج نشان داد که ارتباط آماری معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌ها و بروز بیماری وجود ندارد. همچین در این مطالعه به بررسی فراوانی و ارتباط ژنوتیپ های مختلف چندشکلی rs2232365 در ژن FOXP3 با بروز بیماری RA در جمعیت زنان و مردان به تفکیک جنسیت پرداخته شد که نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف این چندشکلی با خطر ابتلا به بیماری RA در جمعیت زنان و مردان ارتباط آماری معنی‌داری ندارد. فراوانی ژنوتیپی در دو گروه بیمار CCP≤30 و CCP>30 اختلاف آماری معنی‌داری داشت. توزیع فراوانی ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار CCP≤30 و CCP>30 نشان داد که شانس افزایش CCP به بالای عدد ۳۰ در افراد مبتلا به RA با ژنوتیپ CC در مقایسه با افراد بیمار با سایر ژنوتیپ ها افزایش می‌یابد.

FOXP3 برای اختصاصیت و حفظ سلول های Treg ضروری است و به عنوان یک تنظیم‌گر اصلی تلقی می‌شود (۱۰). در مطالعه Lin و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ژن FOXP3 و بیماری RA، بیان این ژن در سرم خون جمعیت افراد بیمار نسبت به جمعیت افراد شاهد به میزان بیشتری دیده شد و نتیجه گیری شد که ژن FOXP3 با بیماری در ارتباط است (۱۶). مطالعاتی مبنی بر ارتباط پلی‌مورفیسم موردنظر با بیماری RA محدود است. در مطالعه Paradowska-Gorycka و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی جمعیت لهستانی، مشخص شد که پلی‌مورفیسم‌های rs2232365 و rs3761548 واقع در منطقه پروموتری ژن FOXP3 با خطر بروز بیماری RA در این جمعیت در ارتباط است (۱۲). از آنجا که FOXP3 به‌عنوان مارکر مهمی در سلول‌های Treg است و عملکرد این سلول‌ها در بیماری‌های اتوایمیون کلیدی است؛ در سایر بیماری های اتوایمیون از جمله مولتیپل اسکلروزیس مطالعاتی در زمینه ارتباط پلی‌مورفیسم‌های FOXP3 ازجمله rs2232365 با بروز بیماری مولتیپل اسکلروزیس انجام شده است. در مطالعه ای که رهنما و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی شیوع فراوانی پلی مورفیسم rs3761549 در ژن FOXP3 در بیماری مولتیپل اسکلروزیس به عنوان یک بیماری اتوایمیون انجام دادند؛ نتیجه گیری شد که فراوانی الل A در بیماران ۱۵/۶ درصد و در افراد کنترل ۹۸/۳ درصد است و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. آلل G در ۹۹/۱ درصد بیماران و ۱۱/۳ درصد افراد کنترل به طور غیرمعنی داری شناسایی شد (۱۷). بهادیوندی چگینی و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی ارتباط پلی مورفیسم های rs56066773 و rs56232250 واقع بر 3'UTR ژن FOXP3 که جایگاه هدف micoRNAs است با بیماری RA (۹۸ مورد و ۱۲۴ شاهد) پرداختند و هیچ ارتباط آماری معنی داری بین این دو پلی مورفیسم و بیماری یافت نگردید (۱۸). در مطالعه مهدوی و همکاران در سال ۲۰۱۶ پلی‌مورفیسم rs2232365 ژن FOXP3 و ارتباط آن با استعداد ابتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس بررسی شد. در آن مطالعه نمونه های خون از ۹۰ نفر بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و ۹۰ فرد سالم جمع آوری شد و اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌های پل‌ی مورفیسم rs2232365 در دو گروه بیمار و سالم یافت شد و نتیجه گیری شد که پلی‌مورفیسم می تواند استعداد افراد را در بروز بیماری تحت تاثیر قرار دهد (۱۹). در مطالعه جعفرزاده و همکاران در سال ۲۰۱۴ میزان سطح IL35 در سرم بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و همچنین ارزیابی تأثیر پلی مورفیسم rs3761548 در ژن FOXP3 برای برنامه درمانی بررسی شد. در آن مطالعه با استفاده از نمونه های ۱۴۰ بیمار (۵۱ بیمار درمان نشده و ۸۹ بیمار تحت درمان) و ۱۴۰فرد سالم (گروه شاهد) مشاهده گردید که متوسط سطح سرمی IL-35 در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و یا افراد سالم با ژنوتیپ AA

در rs3761548 در مقایسه با افرادی که ژنوتیپ CC داشتند؛ به‌طور قابل توجهی پایین‌تر است و بین بیماران مبتلا درمان نشده و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت (۲۰).

در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات پیشینی که بر روی سایر بیماری‌های اتوایمیون انجام شده؛ نتایجی متفاوتی به‌دست آمد که انجام این پژوهش در حجم نمونه بالاتر و بر روی سایر قومیت‌های ایرانی به‌منظور دست‌یابی به یک جمع‌بندی مستدل در زمینه ارتباط میان این پلی‌مورفیسم و نیز سایر پلی‌مورفیسم‌های پروموتر ژن FOXP3 با خطر بروز بیماری RA توصیه می‌شود.

با توجه به عدم ارتباط پلی‌مورفیسم موردنظر با خطر ابتلا به RA در جمعیت مورد مطالعه، این عدم ارتباط می‌تواند یا به دلیل تعداد کم بودن نمونه‌های مورد مطالعه باشد و یا پلی‌مورفیسم rs2232365 در بروز بیماری RA نقشی ندارد. در حالی که در مبتلایان می‌تواند با پیشرفت بیماری همراه باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که بین پلی‌مورفیسم rs2232365 در پروموتر ژن FOXP3 با بروز بیماری آرتریت روماتوئید در جمعیت ایرانی ارتباطی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۵۲۰۳۲) خانم نسیمه محمودی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی ملکولی - ژنتیک از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بود. بدین‌وسیله از کارکنان آزمایشگاه های مهدیه و برادران و بیمارستان امیرالمومنین اصفهان که در جمع‌آوری نمونه‌ها ما را یاری نمودند؛ صمیمانه تشکر می‌نماییم. نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Dowman B, Campbell RM, Zgaga L, Adeloye D, Chan KY. Estimating the burden of rheumatoid arthritis in Africa: A systematic analysis. J Glob Health. 2012 Dec; 2(2): 020406. doi: 10.7189/jogh.02.020406

2. Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 2005 May; 140(2): 195-204. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02744.x

3. Edwards CJ, Cooper C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 2006 Jan; 143(1): 1-5. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02940.x

4. Molina V, Shoenfeld Y. Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. Autoimmunity. 2005 May; 38(3): 235-45. doi: 10.1080/08916930500050277

5. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2009 Jun; 60(6): 1647-56. doi: 10.1002/art.24568

6. Waite JC, Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. Int J Inflam. Volume 2012, Article ID 819467. http://dx.doi.org/10.1155/2012/819467

7. McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. Trends Immunol. 2002 Sep; 23(9): 450-55.

8. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol. 2002 Jun; 2(6): 389-400. doi: 10.1038/nri821

9. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. Nat Immunol. 2007 Mar; 8(3): 277-84. doi: 10.1038/ni1437

10. Pillai V, Karandikar NJ. Human regulatory T cells: a unique, stable thymic subset or a reversible peripheral state of differentiation? Immunol Lett. 2007 Nov; 114(1): 9-15. doi: 10.1016/j.imlet.2007.08.012

11. Lozano T, Casares N, Lasarte JJ. Searching for the Achilles Heel of FOXP3. Front Oncol. 2013 Dec; 3: 294. doi: 10.3389/fonc.2013.00294

12. Paradowska-Gorycka A, Jurkowska M, Felis-Giemza A, Romanowska-Próchnicka K, Manczak M, Maslinski S, et al. Genetic polymorphisms of Foxp3 in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2015 Feb; 42(2): 170-80. doi: 10.3899/jrheum.131381

13. Naderi-Mahabadi F, Zarei S, Fatemi R, Kamali K, Pahlavanzadeh Z, Jeddi-Tehrani M, et al. Association study of forkhead box P3 gene polymorphisms with unexplained recurrent spontaneous abortion. J Reprod Immunol. 2015 Aug; 110: 48-53. doi: 10.1016/j.jri.2015.04.001

14. Hashemi V, Farrokhi AS, Tanomand A, Babaloo Z, Hojjat-Farsangi M, Anvari E, et al. Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in Iranian population. Immunol Lett. 2018 Dec; 204: 16-22. doi: 10.1016/j.imlet.2018.10.001

15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb; 16(3): 1215.

16. Lin SC, Chen KH, Lin CH, Kuo CC, Ling QD, Chan CH. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. Eur J Clin Invest. 2007 Dec; 37(12): 987-96. doi: 10.1111/j.1365-2362.2007.01882.x

17. Rahnama R, Mansouri R, Valizadeh H, Rahimdel A, Eslami G. [Investigating Prevalence of FOXP3 Gene Polymorphism in Multiple Sclerosis]. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci. 2015; 22(6): 1604-11. [Article in Persian]

18. Bahadivand Chegini H, Pourgheysari B, Pourahmadiyan A, Kazemi S, Shirzad H, Mosavi M, et al. [Association between rs56066773 and rs56232250 polymorphisms of FOXP3 gene in target site of microRNA with rheumatoid arthritis in patients referred to Emam Ali clinic of Shahrekord]. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(1): 9-17. [Article in Persian]

19. Mahdavi R, Jamali M, Rostami M, Safa A, Jafarzadeh A, Naseri M. [FOXP3 polymorphism rs2232365 and its association with multiple sclerosis susceptibility]. Tehran Univ Med J. 2016; 74(6): 425-32. [Article in Persian]

20. Jafarzadeh A, Mahdavi R, Jamali M, Hajghani H, Nemati M, Ebrahimi HA. Increased Concentrations of Interleukin-33 in the Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Multiple Sclerosis. Oman Med J. 2016 Jan; 31(1): 40-45. doi: 10.5001/omj.2016.08