مقاله پژوهشی

بررسی و مقایسه میزان تغییرات نابجای متیلاسیون توالی DNA پروموتوری ژن *TLR4* در بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده و افراد سالم

مینا السادات هاشمی[۱]، لیلا پیشکار[۱*]، حمید اسدزاده عقدائی[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: شیوع بیماری‌های التهابی روده با توجه به گزارش‌های وزارت بهداشت ایران رو به افزایش است. نقش عملکردی ژن *TLR4* به‌عنوان واسطه پاسخ‌های ایمنی ذاتی به میکروب‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش و ارتباط آن با تغییرات اپی ژنتیک در پاتوژنز این بیماری دارای اهمیت است. هدف ما بررسی تغییرات نابجای متیلاسیون توالی DNA پروموتوری ژن *TLR4* در بیماران التهابی روده و ارزیابی این ژن به‌عنوان یک بیومارکر جهت تشخیص در این بیماری است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی، از نوع مورد-شاهدی بر روی DNA استخراج‌شده از خون محیطی ۳۵ بیمار مبتلا به بیماری‌های التهابی روده و ۲۰ فرد سالم به‌عنوان کنترل انجام گرفت. به‌منظور بررسی تغییرات متیلاسیون پروموتر توالی DNA ژن *TLR4* در بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده و افراد سالم از تکنیک High resolution melting(HRM) استفاده شد.

نتایج: طبق یافته‌های حاصل از این مطالعه، تجزیه‌وتحلیل سطح متیلاسیون نواحی CPG پروموتور ژن *TLR4*، اختلاف آماری معنی‌داری در مقایسه بین ۳۵ بیمار التهابی روده و ۲۰ فرد سالم نشان نداد (p= ۰/۵۲۵). همچنین در این مطالعه تغییرات متیلاسیون در ارتباط با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک انجام شد که ارتباط معناداری مشاهده نگردید. در مقایسه بین سطح متیلاسیون در قوم فارس نسبت به سایر قوم‌های کرد، لر، ترک، گیلانی، عرب، مازندرانی و افغان ارتباط معنادار مشاهده گردید (p= ۰/۰۳۵).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری از مقایسه سطح متیلاسیون توالی پروموتوری ژن *TLR4* در خون بین بیماران التهابی روده و افراد سالم وجود ندارد، لذا متیلاسیون توالی پروموتوری ژن *TLR4* مارکری اختصاصی در خون محیطی جهت تشخیص و درمان بیماری التهابی روده نیست.

کلمات کلیدی: بیماری‌های التهابی روده، ژن *TLR4*، متیلاسیون DNA، Real-time qPCR، High resolution melting(HRM)

مقدمه

بیماری‌های التهابی روده شامل دو نوع کرون و کولیت اولسرو است که اغلب از لحاظ پاتوژنز مشابه هستند، علی‌رغم شباهت‌هایی که سبب شده در یک گروه قرار گیرند، از مهم‌ترین تفاوت‌های بین این دو بیماری در این است که در ۸۰٪ بیماران مبتلا به ک رون لایه‌های عمیق‌تر جداره روده تحت تأثیر قرارگرفته و حداکثر شیوع آن در گروه سنی ۱۶ تا ۲۵ سال است، درحالی‌که در بیماری کولیت اولسرو بیشتر قسمت‌های سطحی درگیر است و بیشتر در سنین ۳۰ تا ۴۰ سالگی مشاهده می‌شود (۱، ۲). این گروه از التهابات مزمن که بر اساس شرایط دستگاه گوارش دوره‌های عودکننده و بهبودی را طی می‌کنند، بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی، بافت‌شناسی، رادیولوژی و آندوسکوپی

*نویسنده مسئول: لیلا پیشکار، گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران
Email: pishkar@iiau.ac.ir
https://orcid.org/ 0000-0002-1428-1515

قابل‌تشخیص هستند (۳). شواهد نشان داده است که ایجاد التهاب در این بیماری ممکن است ناشی از عوامل مستعد کننده ژنتیکی (ژن‌های کد کننده پروتئین‌های مربوط به سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی مانند: Toll-Like Receptor(TLR) و عوامل محیطی (آنتی‌ژن‌های حاصل از باکتری‌ها) باشد (۴). قرار گرفتن در معرض پاتوژن (عوامل میکروبی بیماری‌زا)، عدم تعادل میکروبی داخل بدن به‌خصوص در طی رشد بیش‌ازحد باکتری در روده کوچک و همچنین تغییرات اپی ژنتیک نیز بر پاتوژنز این بیماری تأثیرگذار است (۵).

شواهد گزارش‌شده تاکنون از این نظریه پشتیبانی می‌کند، که فاکتورهای اپی ژنتیکی می‌توانند عوامل تنظیم‌کننده مناسب در بیان ژن‌های دخیل در بیماری التهابی روده باشد (۶). آنالیزهای اپی ژنتیک وسیع در سطح ژنوم، به‌طور فزاینده‌ای برای درک بهتر اینکه چگونه مکانیسم‌های تنظیمی مانند متیلاسیون DNA می‌تواند بر استعداد ابتلا به بیماری‌های التهابی روده اثر بگذارند، بکار برده می‌شوند. ضمناً تلاش‌هایی برای مهار چالش‌های دخیل و درک ارتباط بین تنوع ژنتیکی و فاکتورهای محیطی (عفونت، میکروبیوتای روده، سیگار کشیدن و رژیم غذایی) با مکانیسم‌های اپی ژنتیکی انجام‌شده است (۷).

ایمنی ذاتی اولین خط دفاع اساسی برای شناخت و آغاز واکنش التهابی در برابر میکروارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهد، پاسخ ایمنی ذاتی متکی به سنجش الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب از طریق ساختارهای تخصصی مانند گیرنده‌های toll-like receptors (TLRs)، nucleotide oligomerization domain-(NOD-) و like receptors (NLRs) است (۸). TLRS از اعضای شناخته‌شده خانواده رسپتورهای تشخیص‌دهنده پاتوژن‌ها Paogen Recognition Receptor (PRRS) می‌باشند و برای اولین بار در انسان در سال ۱۹۹۸ گزارش شد و نقش مهمی در شروع پاسخ ایمنی ذاتی و نسبت به عوامل بیماری‌زای میکروبی بازی می‌کنند (۹). درمجموع ۱۰ نوع از گیرنده‌های Toll-Like در انسان بیان‌شده که هریک از این گیرنده‌های Toll-Like با پاسخ به الگوهای مولکولی مرتبط میکروبی (PAMP) منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنال دهی خاص می‌شود. به‌طور مثال TLR4 پس از شناسایی و اتصال به مولکول‌های مرتبط غشایی مانند لیپوپلی ساکارید، اطلاعات را از مسیر سیگنال دهنده داخل سلولی به سلول منتقل کرده و سبب القاء پاسخ‌های ایمنی به یک پاتوژن خاص (باکتری گرم منفی) می‌شود (۴). TLR4 به‌عنوان بهترین گیرنده شناسایی پاتوژن، از ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی ذاتی و دفاع ضد میکروبی است و در بیماری‌زایی بیماری التهابی روده دخالت دارد (۴، ۱۰). پروموتور ژن *TLR4* دارای یک جعبه TATA در نواحی سایت‌های SP-I بوده و توالی ژنومی آن به ترتیب از ۶۱۱ bp تا ۱۰۳۸ bp است. نواحی جفت نوکلئوتید CPG موجود در پروموتور این ژن نزدیک سایت‌های مهم رونویسی واقع‌شده است (۱۱). TLR4 با شناخت بخش لیپید A از مولکول LPS (lipopolysaccharid) و تشکیل یک همو دایمر به وجود دو مولکول CD14 و MD2 به شکل یک مجموعه برای آغاز سیگنال نیازمند است (۱۲). مسیر عمده سیگنال دهی این گیرنده با فعال شدن فاکتورهای رونویسی NF-KB ، IRF3، MAPK-p38 و jnk توسط مولکول‌های تعدیل‌کننده MYD88، IRAM و MAL منجر به تولید طیف گسترده‌ای از سایتوکاین، کموکاین‌های واسطه‌ای و افزایش بیان بسیاری از ژن‌های پیش التهابی مهم دیگر برای کنترل عفونت می‌شود. بیان ژن *TLR4* در سلول‌های اپیتلیال روده و سلول‌های تک‌هسته‌ای لامینا پروپریا به‌طور قابل‌توجهی در شرایط التهابی حاد مانند بیماری التهابی روده افزایش می‌یابد اگرچه به‌طورمعمول سلول‌های ایمنی و انتروسیت‌ها مکان‌های عمده‌ای از بیان این ژن هستند (۴، ۹). در روده یک انسان سالم یک هموستاز پایدار با تعدیل بار میکروبی و پاسخ ایمنی تولیدشده در برابر آن برقرار است. تداخل گیرنده *TLR4*با لیگاندهای LPS زمینه را برای باکتری‌های گرم منفی ازجمله: کمپیلو باکترژژونی (Cmpylobacte jejuni)، سالمونلا (Salmonela)، گاستروانتریتیدیس (Gastroenteritis) که یک اثرپاتوژنیک در هموستاز روده دارند، فراهم کرده و درنهایت منجر به ایجاد حالت دیسبیوزیس (عدم تعادل میکروبی) و افزایش استعداد ابتلا به بیماری‌های التهابی روده می‌شود. چنانچه فعال‌سازی *TLR4* منجر به تحریک سلول‌های T پیش التهابی از زیرگروه خانواده Th1 و Th2 و مهار سلول‌های T ضدالتهابی تنظیمی Treg در مخاط ملتهب بیماران التهابی روده نیز می‌شود (۴، ۱۳).

یافته‌های جدید حاکی از آن است جایگاه‌های متیلاسیون DNA به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی اپی ژنتیک، با توجه به نقشی که در تنظیم بیان ژن‌های خاص دارد، می‌تواند در نواحی ملتهب در بیماران التهابی روده از نواحی غیر ملتهب قابل‌تشخیص باشد (۱۰). متیلاسیون DNA عموماً در پروموتور ژن و جفت نوکلئوتید (CPG) در ژنوم رخ‌داده و از طریق

فعالیت خانواده‌ی آنزیمی DNA متیل ترانسفرازها (DNMT 3a DNMT1 / DNMT 3b) صورت می‌گیرد. طبق مطالعات Low D و همکاران در این زمینه، (DNM 3a) با توجه به نقش مهمی که در سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد، عامل افزایش سطوح متیلاسیون (هایپرمتیلاسیون) مناطق CpG پروموتور سایتوکاین‌های پیش التهابی IFN-γ و TNF-α (ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی در مقابل آنتی‌ژن‌های میکروبی) در سلول‌های T محیطی بیماران کرون نسبت به افراد سالم است (۱۴). حضور سایتوکاین‌های التهابی مانند IFN-γ و TNF-α، به‌شدت تنظیم‌کننده افزایش بیان ژن *TLR4* در سلول‌های اپیتلیال روده هستند. بنابراین فعالیت *TLR4* در هنگام اختلال در اپیتلیوم روده، با فعالیت Th و خروج و بیان سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی و همچنین با به‌کارگیری سلول‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی برای محدود کردن تهاجم باکتریایی موردنیاز است (۴). اخیراً مطالعاتی گزارش‌شده است که رونویسی از ژن *TLR4* توسط مکانیسم‌های اپی ژنتیکی تنظیم‌شده است و همچنین تغییرات الگوی متیلاسیون در بیماری‌های دهان، بیماری التهابی پریودنتیت مزمن، کارسینوم سلول‌های سنگفرشی، کارسینوم زبان و کراتوسیت اودونتوژنیک (odontogenic keratocyst) مطرح‌شده است (۱۱).

از این‌رو مقایسه و عملکرد تغییرات اپی ژنتیک در افراد سالم و بیمار در بیماری التهابی روده مهم است و با توجه به نقش عملکردی گیرنده‌های Toll-Like به‌عنوان واسطه پاسخ‌های ایمنی ذاتی به میکروب‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش، ما در تحقیق حاضر بر آن شدیم که تغییرات متیلاسیون مناطق CpG پروموتور ژن *TLR4* را در خون محیطی بیماران التهابی روده و افراد سالم مقایسه و همبستگی بین اطلاعات کلینیک و پاتولوژی را بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی (Case-control) در سال ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی‌های بیماری‌های گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، انجام پذیرفت. پس از مراجعه بیماران (مردان و زنان) با محدوده سنی ۳۰ تا ۵۰ سال به این مرکز، بررسی نتایج پاتولوژی و کلونوسکوپی توسط پزشک متخصص انجام و پس از ارزیابی معیار ورود و خروج شرکت‌کنندگان دارای شرایط وارد مطالعه گردیدند. پس از تکمیل رضایت‌نامه، پرسشنامه اطلاعاتی درزمینهٔ سابقه مصرف دارو نیز از بیماران دریافت شد؛ و همچنین بیماران با توجه به نظر پزشک متخصص در هر گروه فاز فعال و غیرفعال تقسیم شدند. نمونه کامل خون محیطی با رعایت اخلاق پزشکی از سه گروه مبتلایان به بیماری کرون (n=۱۵)، بیماران مبتلا به بیماری کولیت اولسرو (n=۲۰) و افراد کنترل (n=۲۰) تهیه گردید. ۳ میلی‌لیتر خون به ویال های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) منتقل و جهت استخراج DNA، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. مطالعه حاضر در کمیته اخلاق پژوهشکده گوارش و کبد، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی‌های بیماری‌های گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد اخلاق IR.SBMU.RIGLD.REC.1393.786 مورد تصویب قرار گرفت.

استخراج و تیمار DNA به‌وسیله بی سولفیت سدیم (Sodium Bisulfit)

در این مطالعه تجربی، DNA ژنومی با جداسازی ۳۰۰ میکرولیتر از بافی کت (buffy coat) به‌وسیله کیت (QIAamp DNA Extraction) کمپانی کیاژن آلمان طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. پس از استخراج DNA به‌منظور ارزیابی کمیت و کیفیت، جذب نمونه نوری DNA با روش اسپکتروفتومتری در طول‌موج‌های 260nm و 280 nm بررسی گردید. در این پژوهش از کیت تیمار بی سولفیت شرکت کیاژن (EpiTect Bisulfite Kits) جهت تیمار توالی DNA استفاده شد.

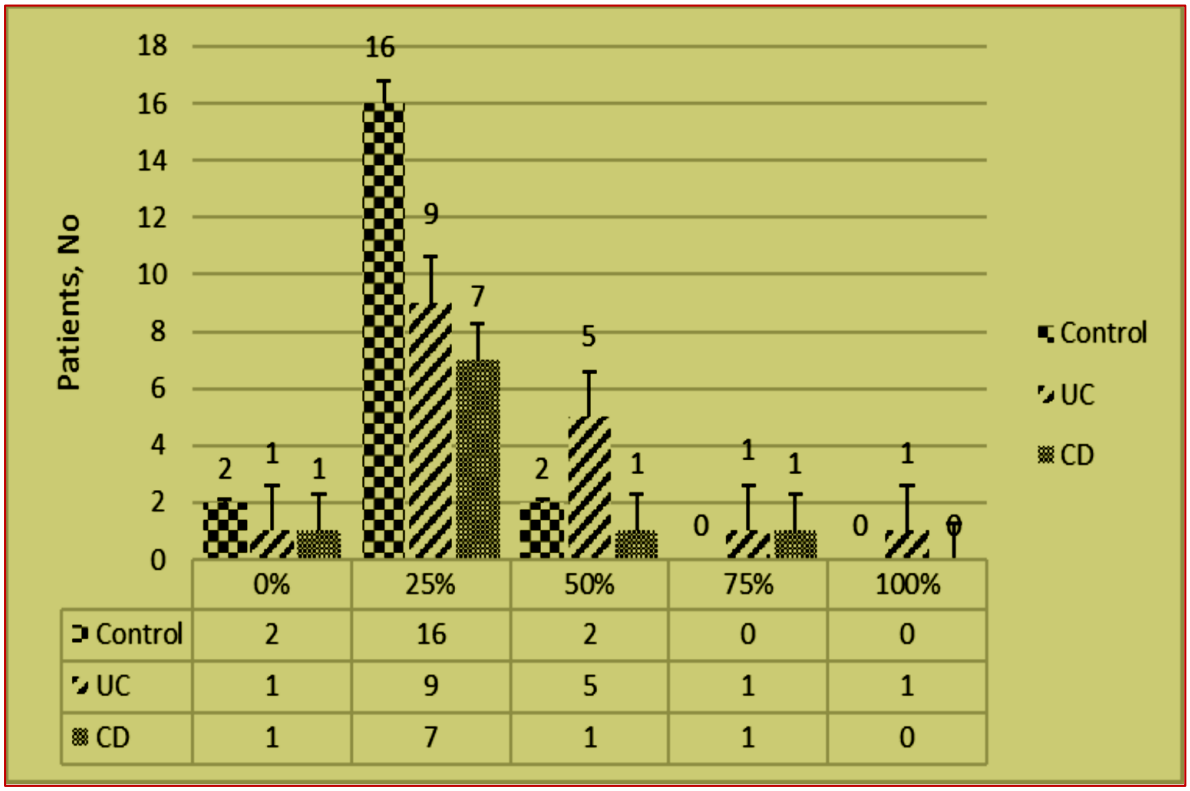
تکنیک HRM (High Resolution melting)

جذابیت استفاده از تکنیک قدرتمند و جدید (HRM) در سهولت، دقت و سرعت عمل آن نسبت به دیگر متدهای تحلیل وضعیت متیلاسیون DNA است (۱۵، ۱۶). به‌منظور تکثیر ناحیه پروموتوری ژن *TLR4*، یک جفت پرایمر به‌طور اختصاصی برای توالی‌های بی سولفیت شده با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی شد و در پایگاه داده http://bisearch.enzim.hu/?m=msp پرایمرها چک گردید. مشخصات توالی پرایمرهای طراحی‌شده و اندازه قطعه تکثیری در واکنش PCR را نشان می‌دهد (جدول ۱). به‌منظور تکثیر توالی DNAپروموتوری ژن *TLR4* از کیت (EpiTect HRM PCR Kit) کمپانی QIAGEN استفاده و جهت بهینه‌سازی واکنش PCR در شرایط زیر اجرا گردید.

برای تعیین صحت انجام پرایمرهای جهت اتصال اختصاصی از کیت EpiTect Control DNA Set جهت کنترل توالی متیله و

جدول ۱- مشخصات پرایمر مورداستفاده جهت تکنیک HRM

طول محصول	Tm (C^0)	CG%	طول پرایمر	توالی پرایمر	نام پرایمر
(bp)۱۹۳	۵۸	۴۰٪	(۲۱)	GTGATTAGAGGAAGAGAAGAT	-F_4TLR
	۵۸	۴۰٪	(۲۱)	CTCTAAAACTCCCAACTTTTCT	-R_4TLR



نمودار ۱- نتایج درصد متیلاسیون پروموتر ژن *TLR4* در پنج گروه (۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪، ۱۰۰٪) در مقایسه با تعداد بیماران التهابی روده و افراد سالم

دمتیله استفاده شد.

حجم کلی واکنش ۲۰ میکرولیتر و مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی بی سولفیت شده، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای R- TLR4 و F-TLR4، ۱۲/۵ میکرولیتر رنگ فلوروسنت (Eva Green) و ۵ میکرولیتر water بود. برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۳۵ سیکل حرارتی (۳۰ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ ثانیه‌ای در ۶۰ درجه سانتی‌گراد همراه با جذب رنگ در کانال سبز)، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و HRM از ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با شیفت حرارتی ۰/۱ سانتی‌گراد با استفاده از نرم‌افزارهای ارائه‌شده بر اساس دستگاه Rotor-Gene انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

به‌منظور آنالیز آماری، داده‌های حاصل از مقایسه سطح متیلاسیون ژن *TLR4* در گروه‌های بیمار و کنترل، از نرم‌افزار SPSSویراست ۱۷ استفاده شد و از طریق آزمون‌های T-test و ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلاف داده‌ها زمانی ازلحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد که کمتر از ۰/۰۵ بود.

نتایج

۳۵ بیمار التهابی روده و ۲۰ فرد سالم با میانگین سنی ۲/۴۴۰ ± ۳۳/۴۰ سال و درصد نمایه توده بدنی نرمال (*BMI*) ۰/۸۷ ± ۲۲/۶۲ در این مطالعه شرکت داشتند. برای ایجاد کنترل‌های مقیاس ۰ تا ۱۰۰٪ متیلاسیون از نمونه‌های متیله و دمتیله کیت

EpiTect Control DNA Set درصدهای ۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ فراهم گردید.

آنالیز اطلاعات به‌دست‌آمده جهت بررسی ارتباط معنی‌دار بین خصوصیات دموگرافیک نظیر جنسیت، قومیت، نوع و فاز بیماری و سابقه مصرف دارو با وضعیت متیلاسیون ژن مذکور در گروه‌های موردمطالعه نتایج زیر را به دنبال داشت. یافته‌های حاصل از تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان داد که تمامی سطوح نواحی پروموتوری ژن *TLR4* در ۵ بیمار کرون و ۳ بیمار کولیت اولسرو به‌طور کامل غیرمتیله بود. اگرچه اکثر نمونه‌ها در هر سه گروه از ۱۰ بیمار کرون ۷ (۲۱/۹٪)، از ۱۷ بیمار کولیت ۹ (۲۸/۱٪)، از ۲۰ فرد کنترل ۱۶(۵۰٪) متیلاسیون با سطح نسبی ۲۵٪ را نشان داد؛ بنابراین طبق نتایج حاصل از آنالیز آماری، هیچ‌گونه اختلاف آماری معناداری از مقایسه سطح نسبی متیلاسیون ژن *TLR4* در بین بیماران التهابی روده و افراد سالم مشاهده نشد ($p=$ ۰/۵۲۵) (نمودار ۱).

وضعیت متیلاسیون ژن *TLR4* در مقایسه با دو فاز فعال و غیرفعال بیماری ($p=$ ۰/۹۳۲) و همچنین مقایسه وضعیت متیلاسیون ژن *TLR4* در دو جنس زن و مرد ($p=$ ۰/۴۶۱) اختلاف آماری معناداری وجود نداشت، و در اکثر نمونه‌ها در هر دو مورد فاز بیماری و جنسیت افراد شرکت‌کننده متیلاسیون با سطح نسبی ۲۵٪ مشاهده شد.

همچنین با استفاده از آنالیزهای آماری ذکرشده ارتباط بین وضعیت متیلاسیون ژن *TLR4* در بیماران با مصرف داروهای مختلف، بررسی شد، نتایج به‌دست‌آمده ارتباط معناداری را نشان نداد. در بین افراد مصرف‌کننده داروی اینفلیکسیمب فقط یک فرد از ۲۵ فرد مصرف‌کننده و همچنین در ۱ فرد از ۲۳ فرد مصرف‌کننده داروی مزالامین، متیلاسیون با سطح ۵۰٪ مشاهده شد. ۱ فرد از ۲۳ فرد با داروی مصرفی سولفازالازین متیلاسیون با سطح ۷۰٪ مشاهده شد. در اکثر بیماران با مصرف سایر داروهای ضدالتهاب رخداد متیلاسیون با سطح نسبی ۲۵٪ را نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج بررسی ارتباط متیلاسیون ژن *TLR4* باسابقه مصرف دارو در بیماران التهابی روده

داروی مصرفی	درصد متیلاسیون	تعداد و درصد بیماران	P-value
مزالازین	٪ ۲۵	۵ (٪ ۳/۳۳)	۰/۴۸۲
آساکول	٪ ۲۵ ٪ ۵۰	۳ (٪ ۲۰) ۳ (٪ ۵۰)	۰/۴۶۰
مزالامین	٪ ۲۵ ٪ ۵۰	۱ (٪ ۶/۷) ۱ (٪ ۱۶/۷)	۰/۹۱۰
سولفازالازین	٪ ۲۵ ٪ ۷۰	۱ (٪ ۶/۷) ۱ (٪ ۵۰)	۰/۲۳۸
آزاتیوپرین	٪ ۲۵	۴ (٪ ۲۶/۷)	۰/۸۳۴
پردنیزولون	٪ ۲۵	۵ (٪ ۳۳/۳)	۰/۴۰۳
هیدروکورتیزون	٪ ۲۵	۱ (٪ ۶/۷)	۰/۹۵۲
کورتنما	٪ ۲۵	۱ (٪ ۶/۷)	۰/۹۵۲
مترونیدازول	٪ ۲۵	۵ (٪ ۳۳/۳)	۰/۷۶۳
اینفلیکسیمب	٪ ۵۰	۱ (٪ ۱۶/۷)	۰/۵۰۹

برخلاف سایر نتایج به‌دست‌آمده، ارتباط معناداری از مقایسه سطح نسبی متیلاسیون در قوم فارس نسبت به سایر قومیت‌های کرد، لر، ترک، گیلانی، عرب، مازندرانی و افغان نشان داد ($p= ۰/۰۳۵$). بیشترین رخداد متیلاسیون با سطح ۲۵٪ در اکثر افراد این مطالعه با قومیت فارس مشاهده شد (جدول ۳).

مشاهده نگردید. در مقایسه بین سطح متیلاسیون در قوم فارس نسبت به سایر قوم‌های کرد، لر، ترک، گیلانی، عرب، مازندرانی و افغان ارتباط معنادار مشاهده گردید. اگرچه مدل توارث این بیماری مبهم است، اما با توجه به شواهد ژنتیک در آن درگیر است و رخداد این وضعیت در موارد خانوادگی و داشتن یک نسبت

جدول ۳- نتایج حاصل از تخمین سطح متیلاسیون پروموتر ژن *TLR4* در بین فراوانی قومیت‌های مختلف

افغان	مازندرانی	گیلانی	عرب	ترک	لر	کرد	فارس	درصد متیلاسیون
۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۱ (٪ ۳۳/۳۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۲ (٪ ۶۶/۷۰)	٪۰
۰ (٪ ۰/۰۰)	۱ (٪ ۳/۱۰)	۱ (٪ ۳/۱۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۱ (٪ ۳/۱۰)	۱ (٪ ۳/۱۰)	۲ (٪ ۶/۳۰)	۲۶ (٪ ۸۱/۳۰)	٪۲۵
۱ (٪ ۱۲/۵۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۷ (٪ ۸۷/۵۰)	٪۵۰
۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۱ (٪ ۵۰)	۱ (٪ ۵۰)	٪۷۵
۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۱ (٪ ۱۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	۰ (٪ ۰/۰۰)	٪۱۰۰

بحث

بیماری‌های التهابی روده گروهی از اختلالات مشخص با التهاب مزمن و عودکننده از دستگاه گوارش است، اگرچه علت دقیق بیماری هنوز ناشناخته باقی‌مانده است ولی در این بیماری پیچیده، پاسخ‌های ایمنی تغییریافته، فاکتورهای محیطی، تغییر در محتوای میکروبی روده و اثر متقابل ژنتیک با این عوامل به تحریک سداپیتلیال روده، افزایش نفوذپذیری روده و هجوم سلول‌های ایمنی کمک می‌کند، ازاین‌رو به‌عنوان یک بیماری چندعاملی شناخته‌شده است (۱۷). ماهیت و عملکرد تغییرات اپی ژنتیک و نقش آن در بیماری‌زایی بیماری‌های التهابی روده در مراحل ابتدایی است اما به‌سرعت در حال پیشرفت است (۱۸).

طبق یافته‌های حاصل از این مطالعه، تجزیه‌وتحلیل سطح متیلاسیون پروموتور ژن *TLR4*، اختلاف آماری معنی‌داری در مقایسه بین بیماران التهابی روده و افراد سالم نشان نداد. همچنین در این مطالعه تغییرات متیلاسیون در ارتباط با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک انجام شد که ارتباط معناداری

مبتلا، یک عامل مهم برای بروز بیماری‌های التهابی روده است (۱۹).

یکی از یافته‌های جدید در ارتباط با مکانیسم پاسخ ایمنی میزبان به محصولات میکروبی و ایجاد التهاب در این بیماری شناسایی خانواده گیرنده‌های Toll-Like است. شواهد تجربی و بالینی نشان داده است که بیان و فعال‌سازی ژن *TLR* به‌طور خاصی در دستگاه گوارش تنظیم می‌شود متیلاسیون DNA بیشترین مطالعه از تغییرات اپی ژنتیکی است که ارتباط آن با بیماری‌های التهابی روده از دهه گذشته پابرجا بوده است (۲۰).

همچنین kricazy و همکاران در سال ۲۰۱۶ تجزیه‌وتحلیل متیلاسیون نواحی CPG را در ژن‌های حاوی مناطق تنظیمی متیله (rDMR) مانند TLR-3 موردبررسی قرار دادند. تفاوت سطح متیلاسیون در بیماران التهابی روده در مقایسه با افراد سالم در این مطالعه مشاهده شد (۱۰). نقش متیلاسیون DNA در بیماری‌زایی بیماری‌های التهابی روده، با عملکرد آن در تنظیم بیان ژن در سلول‌های اپیتلیال روده انسان توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۱۰). بااین‌حال اهمیت ژن *TLR4* به‌عنوان یکی

از ژن‌های دخیل در ایمنی ذاتی و دفاع ضد میکروبی، در این مورد نادیده گرفته‌شده است. به‌این‌ترتیب در این مطالعه تغییرات نابجای متیلاسیون توالی DNA پروموتوری ژن *TLR4* را در بیماران التهابی روده و افراد سالم بررسی کردیم؛ اما یکی از دلایلی که می‌تواند عدم معناداری را توضیح دهد بررسی آنالیزهای ما در خون بیماران بود. در این مطالعه یکی از اهداف ما یافتن مارکری غیرتهاجمی بود. لذا مطالعاتی نشان می‌دهد که متیلاسیون DNA ژن *TLR4* حائز اهمیت است که می‌توان به مطالعه انجام‌شده توسط Donal و همکاران در سال ۲۰۱۵، اشاره کرد در این مطالعه ژن *TLR4* به‌طور عمده در پاسخ به سیگنال LPS باکتری‌های گرم منفی ازجمله Ecoli و شیگلا بیان می‌شود و مسیر سیگنال دهی آن با تشدید التهابات روده همراه است (۲۱). ازآنجایی‌که گزارش‌های فراوانی، رابطه بین متیلاسیون ژن *TLR4*، التهاب و عفونت‌های موضعی رانشان می‌دهد. ازاین‌رو گزارش‌های مطرح‌شده پیشنهادکننده این مطلب است که التهابات ایجادشده، می‌تواند علت و یا حاصل تغییرات متیلاسیون DNA ژن *TLR4* باشد. تحقیق انجام‌شده توسط oliveria و همکاران در سال ۲۰۱۱، نشان داده است که ترکیبات LPS باکتریایی، عامل ایجاد متیلاسیون Denovo در جایگاه‌های CPG پروموتور ژن *TLR4* در سلول‌های جنینی موش و سلول‌های اپیتلیال در تومورهای معده است. درواقع نتایج oliveria نشان داد که ایجاد تغییرات در فلورمیکروبی به‌طور مستقیم با تغییرات متیلاسیون مناطق CPG پروموتوری ژن *TLR4* در نواحی ملتهب بیماران مرتبط بوده است (۱۱).

مطالعات انجام‌شده توسط Frosali و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده است که سطح mRNA و همچنین پروتئین TLR4 در مخاط کولون ملتهب کودکان مبتلا به بیماری التهابی روده در مقایسه با مخاط غیر ملتهب و کنترل به‌طور قابل‌توجهی افزایش‌یافته است (۴). این موضوع مؤید این مطلب است که میزان بیان ژن *TLR4* با خطر ابتلا به این بیماری مرتبط است. ازاین‌رو پیشنهاد می‌شود جهت تعمیم نتایج این مطالعه و بررسی دقیق‌تر ارتباط ژن مذکور با بیماری التهابی روده مطالعه‌ای در مورد میزان بیان ژن *TLR4* نیز صورت بگیرد. لازم به ذکراست وضعیت متیلاسیون DNA در نواحی CPG موجود در نواحی پروموتوری ژن *TLR4*، می‌تواند تنظیم‌کننده رونویسی mRNA، در ساختارهای کروماتینی نزدیک نواحی پروموتوری ژن‌های درگیر در فعالیت Transcriptional باشد. ازاین‌رو نمی‌توان از رخداد فرایند متیلاسیون DNA در نواحی پروموتوری ژن *TLR4* به‌عنوان یک مکانیسم فعال صرف‌نظر کرد.

مطالعه حاضر برای نخستین بار به بررسی ارتباط تغییرات متیلاسیون ژن *TLR4* با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک و فازهای بیماری‌های التهابی روده پرداخت. با توجه به این‌که مکانیسم متیلاسیون ژن *TLR4* در بیماران التهابی روده حائز اهمیت است و ازآنجایی‌که اختلاف ژنتیکی و اپی ژنتیکی بسیار زیادی بین جوامع ایرانی با سایر جوامع غربی مشاهده‌شده است. لذا پروفایل اپی ژنتیکی این ژن می‌تواند راه‌کارها و دیدگاه‌های جدیدی را در حوزه تشخیص، درمان و ارزیابی پاسخ به درمان این بیماری فراهم کند. اگرچه در این مطالعه تعداد محدود نمونه، عاملی برای منع نتیجه‌گیری قوی بود. ازاین‌رو انجام مطالعات تعقیبی مبتنی بر تکنولوژی ارزیابی متیلاسیون ژن *TLR4* در جوامع آماری گسترده‌تر با تعداد نمونه‌های وسیع‌تر، یک امیدواری در آینده برای تشخیص بالینی و درمانی با استفاده از مارکرهای مورد هدف است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر در کمیته اخلاق پژوهشکده گوارش و کبد، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی‌های بیماری‌های گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد اخلاق IR.SBMU.RIGLD.REC.1393.786 مورد تصویب قرار گرفت. این مقاله برگرفته از پروژه پایان‌نامه کارشناسی ارشد مینا سادات هاشمی مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافع ندارند.

References

1. Legaki E, Gazouli M. Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases. WORLD J GASTROENTERO. 2016;7(1):112.

2. Knight P, Campbell BJ, Rhodes JM. Host-bacteria interaction in inflammatory bowel disease. Br Med Bull. 2008;88(1):95-113.
3. Marco Gasparetto, Andrew S. Day, Henderson P. Epidemiology and Natural History of IBD in the Paediatric Age. GASTROENT RES PRACT. 2014; 1(5): 432807
4. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the intricate interaction among toll-like receptors, microbiota, and intestinal immunity can influence gastrointestinal pathology. J Immunol Res. 2015; 1(5): 489821.
5. Moller FT, Knudsen L, Harbord M, Satsangi J, Gordon H, Christiansen L, et al .Danish cohort of monozygotic inflammatory bowel disease twins: Clinical characteristics and inflammatory activity. World J Gastroenterol. 2016;22(21):5050.
6. Stylianou E. Epigenetics: The Fine Tuner in IBD? CURRENT OPINION IN GASTROENTEROLOGY. 2013;29(4):370.
7. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature. 2012;491(7422):119.
8. Elia PP, Tolentino YFM, Bernardazzi C, de Souza HSP. The Role of Innate Immunity Receptors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Mediat Inflamm. 2015; 1(3): 936193.
9. Hosseini AM, Majidi J, Baradaran B, Yousefi M. Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases .Adv. Pharm. Bull. 2015;5(1):605.
10. Kraiczy J, Nayak K, Ross A, Raine T, Mak TN, Gasparetto M, et al. Assessing DNA methylation in the developing human intestinal epithelium: potential link to inflammatory bowel disease. Mucosal Immunol. 2016;9(3):647.
11. De Oliveira NFP, Andia DC, Planello AC, Pasetto S, Marques MR, Nociti Jr FH, et al. TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis. Mucosal Immunol. 2011;38(11):975-83.
12. Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. Nat. Rev. Rheumatol. 2016;12(6):344.
13. Cianci R, Lolli S, Pagliari D, Gambassi G, Frosali S, Marmo R, et al. The involvement of IgH enhancer HS1. 2 in the pathogenesis of Crohn's disease: how the immune system can influence a multifactorial disease. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(17):3618-27.
14. Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. DNA methylation in inflammatory bowel disease and beyond. WORLD J GASTROENTERO. 2013;19(32):5238.
15. Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting. Biochem Soc Trans. 2009; 37 (2): 433–437.
16. Laurie AD, George PM. Evaluation of high-resolution melting analysis for screening the LDL receptor gene. Clin Biochem. 2009;42(6):528-35.
17. Novak EA, Mollen KP. Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. Frontiers in cell and developmental biology. Front Cell Dev Biol. 2015; 1(3): 62.
18. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. Annu Rev Pathol. 2011;6:479-507.
19. Loddo I, Romano C. Inflammatory bowel disease: genetics, epigenetics, and pathogenesis. Frontiers in immunology. FRONT IMMUNOL. 2015; 6(11): 551.
20. Karatzas PS, Gazouli M, Safioleas M, Mantzaris GJ. DNA methylation changes in inflammatory bowel disease. Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology. Ann Gastroenterol. 2014;27(2):125.
21. Sheehan D, Moran C, Shanahan F. The microbiota in inflammatory bowel disease. J. Gastroenterol. 2015;50(5):495-507.

Original Article

Evaluation and Comparison of Aberrant Methylation Changes in Tlr4 Gene Promoter DNA Sequencing in Patients with Inflammatory Bowel Disease and Healthy Individuals

Hashemi MS[1], Pishkar L[1]*, Asadzadeh Aghdaei H[2]

1. Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran
2. Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 01 May 2020 Accepted: 21 July 2020

Abstract

Background & Objective: According to the Iranian Ministry of Health prevalence of register-identified inflammatory bowel disease among Iranian patients increased. The functional role of the TLR4 gene as a mediator of innate immune responses to pathogenic microbes in the gastrointestinal tract and its relationship to epigenetic changes is important. Our goal is to investigate the promoter DNA methylation of TLR4 gene in inflammatory bowel disease and to evaluate TLR4 gene as a biomarker to diagnose the disease.

Materials & Methods: In this case-control study, DNA was extracted from peripheral blood of 55 volunteers including 35 patients with IBD and 20 healthy controls. High resolution melting technique (HRM) was used to investigate the promoter methylation changes of TLR4 DNA sequence in patients with inflammatory bowel disease and healthy controls.

Results: According to the results of this study, methylation level analysis of CpG regions of TLR4 promoter showed no significant difference between 35 inflammatory bowel patients and 20 healthy individuals (P = 0.525). Also in this study, methylation changes were performed in relation to clinicopathological features that no significant relationship was observed. A significant assocation was observed between the levels of methylation in Fars compared to other ethnic groups such as Kurdish, Lor, Turk, Gilani, Arab, Mazandaran and Afghan (= 0.035 P Value).

Conclusion: This study showed that there is no significant relationship between the level of promoter methylation of TLR4 gene in the blood of patients with inflammatory bowel disease and healthy individuals.

Keywords: Inflammatory bowel disease, *TLR4* gene, DNA methylation, Real-time PCR, High resolution melting (HRM)

***Corresponding Author: Pishkar Leila,** Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran
Email: pishkar@iiau.ac.ir
https://orcid.org/ 0000-0002-1428-1515