

## Ets1 gene (Ets Proto-Oncogene1) expression changes in patients with celiac disease under a gluten-free diet

Maedeh Nafari<sup>1</sup> , Flora Forouzesh<sup>1\*</sup> , Mohammad Javad Ehsani-Ardakani<sup>2</sup> , Mohammad Rostami-Nejad<sup>2</sup> <sup>1</sup>Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.<sup>2</sup>Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received: 6 Jun 2022

Accepted: 4 Oct 2022

ePublished: 1 Jan 2023

#### Keywords:

- Autoimmune disease
- Celiac disease
- *Ets1* gene
- Gluten-free diet

### Abstract

**Background.** One of the effective genes in the pathogenesis of the celiac disease is the *Ets1* gene, which encodes the transcription factor *Ets1* and is highly conserved during evolution. The *Ets1* gene inhibits the differentiation of T helper 17 (Th17) cells and the production of interleukin-17A (IL-17A) by these cells and decreased expression of the *Ets1* gene can lead to autoimmune disorders. This study aimed to evaluate the changes in *Ets1* gene expression in the blood samples of patients with celiac disease compared with the control group.

**Methods.** Blood samples were collected from twenty patients with celiac disease under a gluten-free diet and also from twenty healthy people. After RNA extraction and cDNA synthesis, a specific primer pair of the *Ets1* gene was designed and its expression changes were examined by real-time PCR.

**Results.** The expression of the *Ets1* gene in patients with celiac disease on a gluten-free diet did not show a significant difference compared with healthy individuals (*P*-value: 0.54).

**Conclusion.** Failure to observe a significant difference between the patient and the control groups can be due to the effect of the duration of the gluten-free diet and also the inadvertent entry of gluten from hidden sources into the diet of patients under treatment.

**Practical Implications.** Based on the study results, it is possible that if the gluten-free diet is followed more strictly and over a longer period of time by patients with celiac disease, the expression of the *Ets1* gene will proceed as expected. This issue needs to be evaluated in future studies with a larger community.

**How to cite this article:** Nafari M, Forouzesh F, Ehsani-Ardakani MJ, Rostami-Nejad M. *Ets1* gene (Ets Proto-Oncogene1) expression changes in patients with celiac disease under a gluten-free diet- Case control. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2023;44(6):531-538. doi: 10.34172/mj.2023.008. Persian.

### Extended Abstract

#### Background

Celiac disease is a chronic autoimmune disease and is caused by the use of specific proteins in genetically susceptible persons. One of the effective

genes in the pathogenesis of celiac disease is the *Ets1* gene, which encodes the *Ets1* transcription factor and is highly conserved during evolution. *Ets1* gene plays a role in the regulation of a series of important

\*Corresponding author; Email: f8forouzesh@gmail.com, forouzesh@iautmu.ac.ir

biological processes in normal cells and tumors and is considered an important regulator for the function of immune cells and a predisposing factor for autoimmune and inflammatory diseases. *Ets1* gene inhibits the differentiation of helper T cells 17 (Th17) and the production of (IL-17A) by these cells, and the reduction of *Ets1* gene expression can cause autoimmune disorders. This study aimed to evaluate the changes in *Ets1* gene expression in the blood samples of patients with celiac disease compared with the control group.

### Methods

Blood samples were collected from 20 patients with celiac disease under gluten free diet and also from 20 healthy people. (Ethic code: IR.SBMU.RIGLD.REC.1399.036). According to the following formula and the advice of a statistician, the sample size was estimated to be 20 cases from the patient group and 20 cases from the control group.

$$n_1 = n_2 = \frac{Z_{\alpha} \sqrt{2p_2(1-p_2)} + Z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{(p_1 - p_2)^2}$$

RNA extraction was performed by the YTA Total RNA Purification Mini Kit (Yekta Tajhiz Azama-Taiwan) following the manufacturer's instructions. The quantitative and qualitative analysis of the extracted RNA were performed using a nanodrop device at 260 nm and 280 nm wavelengths and electrophoresis on 1% agarose gel, respectively. In the next step, the synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed using the 2 step 2x RT-PCR Pre-mix Taq kit (Biofact-Korea) based on the protocol included in the kit.

A specific primer pair was designed for *Ets1* gene and the reference gene of beta2-microglobulin ( $\beta 2MG$ ). In order to achieve the best suitable temperature for *Ets1* gene amplification, gradient PCR was performed in the temperature range of 57-61 °C. In this study, the non-specific form of Real-Time PCR (use of Cyber-green) was used to investigate *Ets1* gene expression. In this study,  $\beta 2MG$  gene was used as a reference gene. In order to ensure the statistical concepts, each sample was analyzed in duplicate. The reaction mixture was prepared according to the Amplicon kit protocol and included

master mix, each forward and reverse primer, cDNA, and the volume of each microtube reached 20  $\mu$ l with deionized distilled water. Delta-delta ct method was used to analyze Real-Time PCR data. In addition, GraphPad, Prism (V.6) and SPSS (V.21) softwares were also used. The results were considered statistically significant with a value of  $P < 0/05$ . The normality of the data was checked by the Shapiro-Wilk method.

### Results

There were 14 women (70%) and 6 men (30%) in the patient group and 12 women (60%) and 8 men (40%) in the control group. The average age of the patient group was  $36.75 \pm 15.26$  and the control group was  $34.32 \pm 4.9$ . The two patient and control groups had no significant differences in terms of gender ( $P$ -value = 0.216) and age ( $P$ -value = 0.747). The most common digestive symptoms of the patients were bloating (65%) and the most common non-digestive symptoms were anemia (67.5%). Most of studied patients studied were in March III (61.9%).

Using PCR technique, *Ets1* gene was identified by self-amplification specific primer and suitable temperature to bind the primer to the target gene. Then, the PCR product was electrophoresed on 1.5% agarose gel. Clear bands were observed at temperatures of 58, 59, and 60 °C. The temperature of 60 °C was selected to perform the Real-Time PCR reaction. The melting curve of *Ets1* gene and internal  $\beta 2MG$  gene is the result of Real-Time PCR reaction. Single peak indicates the specificity of these primers. According to the results, the change in the expression of *Ets1* gene in comparison with the control group was not statistically significant ( $P$ -value = 0.54). Moreover, no significant relationship was observed between the expression of this gene and the the patients' symptoms.

### Conclusion

Results indicate that *Ets1* gene expression in patients with celiac disease who are on a gluten-free diet did not show any significant difference in comparison with the control group. This result can be due to the effect of the duration of gluten-free diet and also the inadvertent entry of gluten from hidden

sources into the diet of patients under treatment, which is better to confirm or reject this possibility by conducting studies with a larger population on patients who were completely on a gluten-free diet for a longer period of time. In addition, patients whose disease has been newly diagnosed and have

not been on a gluten-free diet so far. Therefore, it is possible that if the duration of adherence to the diet is increased, the expression of the Ets1 gene will also increase as expected, which needs to be evaluated in future studies

## تغییرات بیان ژن Ets1 (Ets Proto-Oncogene1) در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن

مآده نفری<sup>۱</sup>، فلورا فروزش<sup>۱\*</sup>، محمد جواد احسانی اردگانی<sup>۲</sup>، محمد رستمی نژاد<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.  
<sup>۲</sup>مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۳/۱۶  
پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۲  
انتشار برخط: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱

#### کلیدواژه‌ها:

- بیماری خودایمن
- بیماری سلیاک
- ژن Ets1
- رژیم فاقد گلوتن

### چکیده

**زمینه.** یکی از ژن‌های مؤثر در پاتوژنز بیماری سلیاک، ژن Ets1 می‌باشد که فاکتور رونویسی Ets1 را کد می‌کند و در طول تکامل بسیار محافظت شده است. ژن Ets1 سبب مهار تمایز سلول‌های T کمکی ۱۷ (Th17) و تولید اینترلوکین-۱۷A (IL-17A) توسط این سلول‌ها می‌شود و کاهش بیان ژن Ets1 می‌تواند باعث بروز اختلالات خودایمنی شود. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات بیان ژن Ets1 در نمونه خون بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل است.

**روش کار.** از بیست بیمار مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن و همچنین از بیست فرد سالم، نمونه خون جمع آوری شد. استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد و سپس جفت پرایمر اختصاصی ژن Ets1 طراحی و تغییرات بیان آن با روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها.** بیان ژن Ets1 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن در مقایسه با افراد سالم اختلاف معناداری نشان نداد ( $P=0/54$ ).

**نتیجه‌گیری.** عدم مشاهده اختلاف معنادار بین گروه بیمار و کنترل می‌تواند ناشی از تأثیر مدت زمان رعایت رژیم غذایی فاقد گلوتن و همچنین ورود گلوتن به طور سهوی از منابع پنهان به رژیم غذایی بیماران تحت درمان باشد.

**پیامدهای عملی.** با توجه به نتیجه مشاهده شده در این مطالعه، این احتمال وجود دارد که اگر رژیم غذایی فاقد گلوتن توسط بیماران مبتلا به بیماری سلیاک، سختگیرانه‌تر و طی مدت زمان بیشتری رعایت شود، بیان ژن Ets1 مطابق انتظار ما پیش رود. این مسئله نیاز است در مطالعات بعدی، با جامعه بزرگتری مورد ارزیابی قرار بگیرد.

### مقدمه

بیماری سلیاک (Celiac Disease, CD) یک بیماری التهابی خودایمن مزمن است که در اثر مصرف پروتئین گلوتن در افراد مستعد ژنتیکی سبب آسیب بافت پرزهای روده کوچک شده و به دنبال آن جذب در روده کاهش یافته و فرد با علائم کمبود مواد مغذی مواجه می‌شود.<sup>۱</sup> گلوتن و بخش‌های پروتئینی اصلی آن، گلیادین و گلوتنین، در گندم، چاودار و جو وجود دارند.<sup>۲</sup> تقریباً همه بیماران مبتلا به CD آنتی ژن لکوسیت انسانی HLA DQ2 (بیش از ۹۰ درصد) یا HLA DQ8 (۵-۱۰ درصد) را بیان می‌کنند. این بیماری در قدم اول از طریق تست‌های سرولوژی و بعد پاتولوژی تعیین می‌شود و اگر نتایج این دو تست در تضاد باهم باشد از تست‌های ژنتیک (HLA Typing) استفاده می‌شود.<sup>۳</sup> به طور کلی CD در ۱-۰/۵ درصد جمعیت اروپا و آمریکا گزارش شده است. بررسی‌های پژوهشگران ایرانی نیز نشان می‌دهد که شیوع این بیماری در ایران حدود ۱ درصد است.<sup>۴</sup>

بیماری سلیاک (Celiac Disease, CD) یک بیماری التهابی خودایمن مزمن است که در اثر مصرف پروتئین گلوتن در افراد مستعد ژنتیکی سبب آسیب بافت پرزهای روده کوچک شده و به دنبال آن جذب در روده کاهش یافته و فرد با علائم کمبود مواد مغذی مواجه می‌شود.<sup>۱</sup> گلوتن و بخش‌های پروتئینی اصلی آن، گلیادین و گلوتنین، در گندم، چاودار و جو وجود دارند.<sup>۲</sup> تقریباً همه بیماران مبتلا به CD آنتی ژن لکوسیت انسانی HLA DQ2

\*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: f8forouzesah@gmail.com، forouzesah@iautmu.ac.ir

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

$$n_1 = n_2 = \frac{Z_{\alpha} \sqrt{2p_2(1-p_2)} + Z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{(p_1 - p_2)^2}$$

با توجه به فرمول بالا و مشاوره متخصص آمار، حجم نمونه از گروه بیمار ۲۰ مورد و از گروه شاهد نیز ۲۰ مورد برآورد گردید.  $Z_{\alpha}$ : confidence interval (CI) فاصله اطمینان.  $Z_{\beta}$ : توان یک آزمون آماری احتمال رد کردن فرض صفر اشتباه می‌باشد.  $P$ : احتمال. استخراج RNA به وسیله کیت یکتا تجهیزآزما (تایوان) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس، بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده به ترتیب با دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت. در مرحله بعد، سنتز cDNA با استفاده از کیت ۲x RT-PCR Pre-mix Taq (بیوفکت-کره) بر اساس پروتکل درج شده در کیت صورت گرفت.

توالی ژن *Ets1* با شماره کد P14921 و ژن مرجع بتا ۲ میکروگلوبولین ( $\beta 2MG$ ) از پایگاه NCBI دریافت و با نرم‌افزار Gene Runner پرایمرها طراحی شدند. سپس، به کمک نرم افزار آنالین NCBI/Primer-BLAST از لحاظ توالی و اتصال اختصاصی به ژن هدف مورد بررسی قرار گرفتند. توالی پرایمر فرادست *Ets1*: 5'-CAGTGTGTTCCACCATCGG-3'، توالی پرایمر فرادست *Ets1*: 5'-GAGGGTCTCGGAGAATGAC-3'، توالی پرایمر فرادست  $\beta 2MG$ : 5'-CCAGCGTACTCCAAAGATTC-3'، توالی پرایمر فرودست  $\beta 2MG$ : 5'-ATGTCGGATGGATGAAACCC-3' می‌باشد.

جهت دست یابی به بهترین دمای مناسب جهت تکثیر ژن *Ets1*، گرادینت PCR در بازه دمایی ۶۱-۵۷ درجه سانتیگراد انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر (10X)، ۱ میکرولیتر از dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۵/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای فرادست و فرودست (۱۰ پیکومول)، ۵/۵ میکرولیتر از Taq DNA polymerase، ۱ میکرولیتر cDNA بود. برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۱-۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه قرار گرفتند. به منظور تکثیر هرچه بیشتر این واکنش سه مرحله ای ۴۰ بار تکرار گردید.

در این مطالعه برای بررسی بیان ژن *Ets1* از Real-Time PCR (استفاده از سایبرگرین) به روش Relative و دستگاه Rotor-Gene Q Series استفاده شد. در این مطالعه از ژن  $\beta 2MG$  به عنوان ژن مرجع استفاده شد. جهت اطمینان از مفاهیم آماری، هر نمونه به

یکی از ژن‌های مؤثر در بیماریزایی CD، ژن *Ets1* است که فاکتور رونویسی *Ets1* را کد می‌کند و در طول تکامل بسیار محافظت شده است. این ژن بر روی کروموزوم 11q24.3 واقع شده است. *Ets1* در تنظیم یک سری از فرآیندهای بیولوژیکی مهم در سلول‌های طبیعی و تومورها نقش دارد و تنظیم کننده مهم برای عملکرد سلول‌های ایمنی و عامل مستعد کننده برای بیماری‌های خود ایمنی و التهابی به شمار می‌رود. بیان این ژن در لنفوسیت‌های B و T بالاست و در سایر سلول‌ها سطح بیان پایین‌تری دارد. بیان بالای آن در لنفوسیت‌ها، باعث شده این ژن به عنوان یک عامل بالقوه برای بیماریزایی بیماری‌های خودایمن توجه زیادی را به خود جلب کند.<sup>۵</sup>

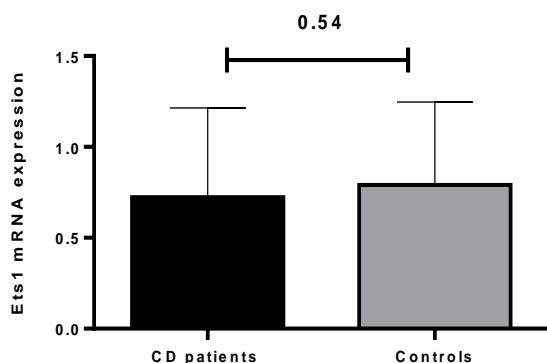
ژن *Ets1* اثر مہاری بر تمایز سلول‌های Th17، که از سلول‌های مهم مسیر بیماریزایی سلپاک است، دارد و تولید سایتوکاین التهابی IL-17A توسط این سلول‌ها را کاهش می‌دهد.<sup>۶</sup> با توجه به اهمیت ژن *Ets1* در بروز بیماری‌های خود ایمن، هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان این ژن در بیماران مبتلا به بیماری سلپاک تحت درمان با رژیم فاقد گلوتن و افراد سالم است.

## روش کار

در این مطالعه، ۲۰ بیمار مبتلا به بیماری سلپاک تحت درمان با رژیم غذایی فاقد گلوتن به مدت ۶ ماه تا ۲ سال، که بیماری آن‌ها با انجام آزمایشات سرولوژی (tTG (tissue Transglutaminase) و IgA, Anti EMA (EndoMysial Antibodies) بررسی بافت شناسی، زیر نظر متخصص گوارش تایید شده بود مورد بررسی قرار گرفتند. آنها به بیماری خودایمن دیگری مبتلا نبودند و برای پیگیری درمان به دیارتمان سلپاک واقع در مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی تهران مراجعه کرده بودند. علاوه بر این، ۲۰ نفر فرد سالم که خود و بستگان آنها به بیماری سلپاک و سایر بیماری‌های خودایمن مبتلا نبوده اند، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

از افراد شرکت کننده ۵ سی سی نمونه خون محیطی توسط پزشک متخصص گرفته شد و پرسشنامه نیز توسط افراد مورد مطالعه تکمیل شد. فاکتورهای خروج برای هر دو گروه کافی نبودن حجم نمونه خون، مناسب نبودن کیفیت RNA استخراج شده و عدم تکمیل پرسشنامه توسط افراد شرکت کننده در مطالعه در نظر گرفته شد. از همه افراد وارد شده به مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه کتبی با مجوز کمیته اخلاق پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دریافت گردید (کد اخلاق: IR.SBMU.RIGLD.REC.1399.036).

مقایسه بیان ژن *Ets1*، در نمونه‌های خون بیماران مبتلا به سلیاک (تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن) و گروه کنترل (افراد سالم) در شکل ۱ آورده شده است. طبق نتایج، تغییر بیان این ژن در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی دار نبود ( $P=0/54$ ). همچنین بین بیان این ژن و علائم بیماران نیز ارتباط معناداری مشاهده نگردد که اطلاعات آن در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۱. تغییرات بیان ژن *Ets1* در بیماران مبتلا به سلیاک (CD) که تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن بودند در مقایسه با گروه کنترل (افراد سالم). ( $P=0/54$ )

### بحث

در این مطالعه بیان ژن *Ets1* به عنوان یکی از ژن‌های مؤثر در بیماری سلیاک، در نمونه خون بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت درمان، با جفت پرایمرهای اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه حاکی از عدم وجود اختلاف معنادار در بیان این ژن بین بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت درمان با رژیم غذایی فاقد گلوتن و گروه کنترل سالم بود ( $P=0/54$ ).

بیماری سلیاک یک بیماری خودایمن است که در آن بیماران پس از مصرف پپتیدهای گلوتن، دچار التهاب شدید روده می‌شوند.<sup>۲</sup> پروتئین *Ets1*، یک فاکتور رونویسی خانواده *Ets* است که عملکرد تنظیمی برای سلول‌های ایمنی دارد و می‌تواند به عنوان تنظیم کننده منفی سلول‌های Th17 عمل کند و تمایز این سلول‌ها را مهار می‌کند. همچنین ژن *Ets1* بسیاری از فرآیندهای سلولی را نیز تنظیم می‌کند و نقش مهمی در بیماری‌های خودایمن دارد.<sup>۸-۱۰</sup>

از آنجایی که درباره ژن *Ets1* به طور اختصاصی در بیماری سلیاک مطالعه ای صورت نگرفته است، از یافته‌های مطالعات پژوهشگران در سایر بیماری‌های خودایمن استفاده شد. یوها و همکاران، طی مطالعه‌ای دریافته‌اند که فاکتور رونویسی *Ets1* برای تکامل طبیعی Tregها مورد نیاز است. کمبود *Ets1* منجر به تغییر

صورت دوتایی گذاشته شد. تهیه مخلوط واکنش مطابق با پروتکل کیت Amplicon انجام شد و شامل ۱۰ میکرولیتر از Master mix، ۵/۵ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای فرادست و فرودست (۱۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر cDNA بود و با آب مقطر دیونیزه حجم هر میکروتیوب به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس تکثیر با برنامه دمایی، ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه، ۱ سیکل و دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه به مدت ۴۰ سیکل انجام گردید.

برای آنالیز داده‌های Real-Time PCR از روش دلتا دلتا ct استفاده گردید. علاوه براین، با بهره‌گیری از نرم افزار GraphPad Prism (V.6) نمودارها رسم گردید. متغیرهای مورد بررسی در این مطالعه با آزمون مستقل T-test، همبستگی اسپیرمن و همبستگی پیرسون با کمک نرم افزار SPSS (V.21) مقایسه گردیدند. نتایج با مقدار  $P < 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. نرمالیتی داده‌ها با روش شاپیرو-ویلک بررسی شده است.

### یافته‌ها

تعداد ۱۴ نفر زن (۷۰ درصد) و ۶ نفر مرد (۳۰ درصد) در گروه بیمار و تعداد ۱۲ نفر زن (۶۰ درصد) و ۸ نفر مرد (۴۰ درصد) در گروه کنترل بررسی شدند. میانگین سنی گروه بیمار  $15/26 \pm$  و گروه کنترل  $34/32 \pm 4/9$  بود. دو گروه بیمار و کنترل از لحاظ جنس ( $P=0/216$ ) و سن ( $P=0/747$ ) با یکدیگر اختلاف معناداری نداشتند. شایع‌ترین علائم گوارشی بیماران نفخ (۶۵ درصد) و شایع‌ترین علائم غیرگوارشی کم‌خونی (۶۷/۵ درصد) بود. عمده بیماران مورد مطالعه در مارش III (۶۱/۹ درصد) قرار داشتند. منحنی ذوب ژن *Ets1* و ژن داخلی  $\beta 2MG$  حاصل از واکنش Real-Time PCR است. تک قله بودن نشان دهنده اختصاصی عمل کردن این پرایمرها می‌باشد.

جدول ۱. ارتباط بین علائم بالینی و بیان ژن *Ets1* در نمونه خون بیماران مبتلا به بیماری سلیاک

علائم بالینی	ضریب همبستگی (r)	P-value
اسهال	-۰/۱۳۱	۰/۵۱۴
دل درد عضلانی	-۰/۷۰۷	۰/۱۸۲
تهوع و استفراغ	-۰/۲۶۶	۰/۱۷۹
نفخ	۰/۱۴۷	۰/۴۴۵
کم خونی	۰/۰۵۸	۰/۷۶۶
کاهش وزن	-۰/۱۹۵	۰/۳۱۰
آفت دهانی	-۰/۱۴۴	۰/۴۶۴
سقط جنین	-۰/۲۰۸	۰/۳۱۸
ناباروری	-۰/۱۴۱	۰/۵۴۳
خستگی	۰/۰۴۲	۰/۸۲۹
پوکی استخوان	-۰/۱۹۰	۰/۳۵۳



هستند در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری نشان نداد. ممکن است طول مدت رژیم غذایی فاقد گلوتن در این تغییرات بیان دیده شده، مؤثر باشد که بهتر است جهت تایید یا رد این احتمال مطالعات با جمعیت بزرگتر بر روی بیمارانی که مدت زمان بیشتری به طور کامل و سختگیرانه تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن بودند و همچنین بیمارانی که بیماری آنها تازه تشخیص داده شده و تاکنون تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن نبوده‌اند صورت گیرد.

### قدردانی‌ها

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه خانم مائده نفری، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران می‌باشد. از پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مسئولین محترم دپارتمان سلیاک بابت همراهی و همکاری صمیمانه، کمال قدردانی و سپاسگزاری را داریم.

### مشارکت پدیدآوران

مائده نفری اجرای مطالعه و نگارش اولیه دست نوشته را به عهده داشته است. محمد رستمی نژاد، فلورا فروزش و محمد جواد احسانی اردکانی طراحی و تحلیل نتایج مطالعه و اصلاح نهایی دست نوشته را انجام داده اند. تمامی نویسندگان نسخه نهایی دست نوشته را خوانده و تایید کرده اند.

### منابع مالی

این مقاله حمایت مالی ندارد.

### دسترسی‌پذیری داده‌ها

داده‌های مقاله حاضر در صورت درخواست معقول از پدید آور رابط ارائه می‌گردد.

### ملاحظات اخلاقی

این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، با کد IR.SBMU.RIGLD.REC.1399.036 تایید شده است.

### تعارض منافع

بدینوسیله پدیدآوران اعلام می‌کنند که این اثر حاصل یک پژوهش مستقل بوده و هیچگونه تضاد منافی با سازمان‌ها و اشخاص دیگری ندارد.

تمایز سلول‌های B، واکنش بیش از حد نسبت به گیرنده (Toll-like receptor, TLR9) و افزایش توانایی سلول‌های T-17 helper در تولید سایتوکاینی مثل IL-17 می‌شود که در نهایت در بیماری‌های خود ایمنی نقش دارند.<sup>۱۱</sup> سان و همکاران، با مطالعه‌ای بر روی ۲۵ بیمار مبتلا به لوپوس درمان نشده (تازه تشخیص داده شده) و ۲۲ فرد سالم نشان دادند که سطح رونوشت *Ets1* در بیماران مبتلا به لوپوس در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش یافته بود.<sup>۱۲</sup> ال لی و همکاران، بیان ژن *Ets1* در خون افراد سالم و بیماران مبتلا به بیماری مالتیپل اسکروزیس در مراحل بهبودی و عودکننده را اندازه‌گیری کردند. کمترین سطح بیان ژن *Ets1* در بیماران مبتلا به MS در مرحله عودکننده در مقایسه با افراد سالم و بیماران در مرحله بهبودی بوده است.<sup>۱۳</sup> بین یانگ و همکاران، با مطالعه بر روی بیماران مبتلا به بیماری آرتریت روماتوئید، بیان کردند که احتمالاً *Ets1* ممکن است بر سطوح سرمی (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand, RANKL) از طریق شبکه سیتوکین، به ویژه IL-17 که به طور قابل توجهی در بیماران RA افزایش یافته است، تأثیر بگذارد. اگرچه مطمئناً ارتباط قطعی بین *Ets1* و RANKL در RA نیاز به حجم نمونه بزرگتر و مطالعه چند مرکزی دارد.<sup>۱۴</sup> همانطور که اشاره شد ژن *Ets1* با مهار تمایز سلول‌های Th17 سبب کاهش تولید IL-17A توسط این سلول‌ها می‌شود. ما در این مطالعه انتظار داشتیم با رعایت رژیم غذایی فاقد گلوتن توسط بیماران مورد مطالعه، بیان ژن *Ets1* افزایش یابد که بتواند اثر مهارتی روی بیان سایتوکاین‌های التهابی IL-17A داشته باشد. اما آنچه که در نتیجه این مطالعه شاهد آن بودیم، عدم تفاوت در بیان ژن *Ets1* بین بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل بود. از جمله دلایل احتمالی این مشاهده می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

ممکن است پروتئین گلوتن به طور سهوی از منابع پنهان وارد رژیم غذایی این بیماران تحت درمان شده باشد، گواه این ادعا علائمی است که بیماران علی‌رغم رعایت رژیم همچنان گزارش می‌دهند و آسیب‌های پاتولوژی‌ای که هنوز بهبود پیدا نکرده است. بنابراین احتمالاً مدت زمان رعایت رژیم توسط بیمار بر بیان این ژن مؤثر بوده و ممکن است در صورت افزایش مدت زمان رعایت رژیم، بیان ژن *Ets1* نیز طبق انتظار افزایش یابد که لازم است صحت آن در مطالعات بعدی مورد ارزیابی قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

طبق نتایجی که در این مطالعه به دست آمد، بیان ژن *Ets1* در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک که تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن

## References

- Asri N, Rostami-Nejad M. The facts of celiac disease; a comprehensive review. *Int J Celiac Dis.* 2019;7(2):48-52. doi:10.12691/ijcd-7-2-7 (In Persian)
- Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac disease: a review of current concepts in pathogenesis, prevention, and novel therapies. *Frontiers in pediatrics.* 2018;6:350. doi: 10.3389/fped.2018.00350 (In Arabic)
- du Pré MF, Sollid LM. T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best practice & research Clinical gastroenterology.* 2015;29(3):413-23. doi: 10.1016/j.bpg.2015.04.001 (In Arabic)
- Nejad MR, Rostami K, Emami MH, Zali MR, Malekzadeh R. Epidemiology of celiac disease in Iran: a review. *Middle East Journal of Digestive Diseases.* 2011;3(1):5. (In Persian)
- Garrett-Sinha LA. Review of Ets1 structure, function, and roles in immunity. *Cellular and molecular life sciences.* 2013;70(18):3375-90. doi: 10.1007/s00018-012-1243-7 (In Arabic)
- Martin AJ, Zhou L, Miller SD. MicroRNA-managing the TH-17 inflammatory response. *Nature immunology.* 2009;10(12):1229-31. doi: 10.1038/ni1209-1229 (In Arabic)
- Van der Graaf A, Zorro MM, Claringbould A, Vösa U, Aguirre-Gamboa R, Li C, Mooiweer J, et al. Systematic prioritization of candidate genes in disease loci identifies TRAFD1 as a master regulator of IFN $\gamma$  signaling in celiac disease. *Frontiers in Genetics.* 2021;8:1780. doi: 10.3389/fgene.2020.562434 (In Arabic)
- Zhao N, Wang Z, Cui X, Wang S, Fan C, Li Y, Shan Z, Teng W. In Vivo Inhibition of MicroRNA-326 in a NOD. H-2h4 Mouse Model of Autoimmune Thyroiditis. *Frontiers in Immunology.* 2021;12:620916. doi: 10.3389/fimmu.2021.620916 (In Arabic)
- Li J, Xia Y, Fan X, Wu X, Yang F, Hu S, et al. HUWE1 Causes an Immune Imbalance in Immune Thrombocytopenic Purpura by Reducing the Number and Function of Treg Cells Through the Ubiquitination Degradation of Ets-1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2021;9:708562. doi: 10.3389/fcell.2021.708562 (In Arabic)
- Zhao N, Zou H, Qin J, Fan C, Liu Y, Wang S, et al. MicroRNA-326 contributes to autoimmune thyroiditis by targeting the Ets-1 protein. *Endocrine.* 2018;59(1):120-9. doi: 10.1007/s12020-017-1465-4 (In Arabic)
- Hou Y, Feng Q, Xu M, Li GS, Liu XN, Sheng Z, et al. High-dose dexamethasone corrects impaired myeloid-derived suppressor cell function via Ets1 in immune thrombocytopenia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2016;127(12):1587-97. doi: 10.1182/blood-2015-10-674531 (In Arabic)
- Sun XG, Tao JH, Xiang N, Li XM, Wang GS, Fang X, et al. Negative correlation between miR-326 and Ets-1 in regulatory T cells from new-onset SLE patients. *Inflammation.* 2016;39(2):822-9. doi: 10.1007/s10753-016-0312-8 (In Arabic)
- Li L, Ma X, Zhao YF, Zhang C. MiR-1-3p facilitates Th17 differentiation associating with multiple sclerosis via targeting ETS1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(12):6881-92. doi: 10.26355/eurrev\_202006\_21678 (In Arabic)
- Yang B, Luo L, Chen L, Niu Q, Zhang J, Xu H, Wu Y, Huang Z. ETS1 polymorphism rs73013527 in relation to serum RANKL levels among patients with RA. *Medicine.* 2021;100(5):12-15. doi: 10.1097/MD.000000000024562 (In Arabic)