

## بررسی همبستگی بین میزان فراوانی پلی مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی در ژن IFNAR2 با شدت بیماری کووید-۱۹

### چکیده

دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۴ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۲/۰۸/۰۱

**زمینه و هدف:** شناخت فرآیندهای پیچیده سیستم ایمنی در مقابله با عفونت کووید-۱۹ که احتمالاً مربوط به پلی مورفیسم در ژن‌های سایتوکین و کموکاین است، می‌تواند وضعیت پیش‌تهابی بیماران را توضیح دهد. بنابراین در تحقیق حاضر همبستگی بین میزان فراوانی پلی مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی در ژن پیش‌تهابی IFNAR2 با شدت بیماری کووید-۱۹ بررسی شد.

**روش بررسی:** این تحقیق توسط کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران بررسی و با کد اخلاقی IR.PIL.REC.1400.042 به تایید این کمیته رسید و از دی ۱۴۰۰ تا آذر ۱۴۰۱ به طول انجامید. این مطالعه بر روی ۹۵۴ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ انجام شد که به دو گروه بهبودیافته و فوت شده تقسیم شدند. پس از اخذ نمونه خون از بیماران و استخراج DNA، ژن IFNAR2 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. سپس پلی مورفیسم‌های rs2236757 در ژن IFNAR2 با روش RFPL و آنزیم محدود کننده Cac8I بررسی شدند. ژنوتیپ افراد با توجه به الگوی باندهای تشکیل شده، مشخص گردید.

**یافته‌ها:** ژنوتیپ‌های AA، GA، و GG به ترتیب با فراوانی ۲۱٪، ۴۷٪ و ۳۲٪ مشخص شدند. فراوانی آللی این پلی مورفیسم نشان داد که ۵۶٪ موارد دارای آلل G و ۴۴٪ دارای آلل A بودند. بررسی همبستگی پلی مورفیسم rs2236757 در ژن IFNAR2 با شدت بیماری کووید-۱۹، عدم نقش این پلی مورفیسم در شدت بیماری ( $OR=1$ ) را نشان داد. از طرفی آلل A در افراد بهبود یافته به‌طور معناداری بیشتر از افراد فوت شده بود و مقدار  $OR < 1$  نیز این مساله را تایید نمود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل نشان داد که پلی مورفیسم rs2236757 در ژن IFNAR2 با کاهش شدت بیماری در ارتباط است که این مساله نشان‌دهنده نقش مهم ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های التهابی و همچنین نقش واریانت‌های ژنتیکی این ژن‌ها در شدت بیماری کووید-۱۹ می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** کووید-۱۹، طوفان سایتوکین، التهاب، پلی مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی.

مهناز صفری<sup>۱</sup>، پونه رحیمی<sup>۲\*</sup>، اکرم  
سادات طباطبایی بفرئی<sup>۱</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق،  
دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.  
۲- بخش هیاتیت و ایدز و بیماری‌های منتقله از  
خون، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، میدان انقلاب، خیابان ۱۲  
فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش هیاتیت و ایدز و  
بیماری‌های منتقله از خون.

تلفن: ۶۶۹۶۲۹۱-۰۲۱  
E-mail: Pooneh5376@yahoo.com

### مقدمه

را به‌عنوان یک بیماری همه‌گیر در ۱۱ مارس ۲۰۲۰ معرفی کند.<sup>۱</sup> از بیماری کووید-۱۹ با فعال کردن پاسخ‌های متنوع سیستم ایمنی، طیفی از بیماری خفیف یا حتی بدون علامت تا بروز واکنش‌های التهابی شدید را ایجاد می‌کند که همین واکنش‌ها موجب عوارض متعدد در

SARS-CoV-2 زمانی که در دسامبر ۲۰۱۹ در شهر ووهان چین گسترش یافت، شهرت یافت و انتشار مداوم آن باعث شد WHO آن

حال، تجزیه و تحلیل جامع SNP های ژن IFNAR2 در هر دو منطقه کدکننده و غیرکدکننده برای یافتن علل از دست دادن عملکرد IFNAR2 در بیماران COVID-19 انجام نشده است. بازسازی پیچیده سیستم ایمنی ناشی از عفونت با SARS-CoV-2، که احتمالاً مربوط به پلی مورفیسیم در ژن‌های سایتوکین و کموکاین است، می‌تواند وضعیت پیش‌التهابی شناخته شده توسط فرسودگی سلولی و طوفان سیتوکین مشخصه ایمنی ناکارآمد و التهاب حاد را توضیح دهد.<sup>۴</sup> بر همین اساس در تحقیق حاضر به بررسی همبستگی بین میزان فراوانی پلی مورفیسیم تک‌نوکلئوتیدی در ژن IFNAR2 با پیامد بیماری کووید-۱۹ پرداخته شد.

## روش بررسی

جمعیت مورد مطالعه: مطالعه حاضر به‌منظور تعیین فراوانی پلی مورفیسیم rs2236757 در ژن IFNAR2 در دو گروه بیماران مبتلا به کووید-۱۹ در کشور و بررسی احتمال ارتباط بین پلی مورفیسیم‌های ژن IFNAR2 با تفاوتی که در پیامد ابتلا به کووید-۱۹ در بیماران مشاهده شد (گروه بیماران بهبودیافته و گروه فوت‌شدگان ناشی از ابتلا به کووید-۱۹) انجام گرفت. نمونه‌ها به‌صورت سرشماری وارد مطالعه شدند و در مجموع تعداد ۹۵۴ نمونه خون محیطی از هر دو گروه بیماران مبتلا به کووید-۱۹ جمع‌آوری شد. ابتلای بیماران به کووید-۱۹ با آزمایش rtReal Time-PCR نمونه‌های سوآب اوروفارنکس یا نازوفارنکس تایید شده بود. بیماران هیچگونه بیماری زمینه‌ای از جمله بیماری قلبی و کلیوی مزمن، دیابت، چاقی، بیماری کبد، سرطان، ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)، بارداری، بیماری انسدادی مزمن ریه، فیبروز کیستیک و آسم (متوسط تا شدید) نداشتند. همه نمونه‌ها در هفته دوم بیماری از بیماران گرفته شده بود و بیماران تا زمان نمونه‌گیری دارویی دریافت نکرده بودند. افراد بیمار از هر دو جنس و در گروه سنی ۶۰-۲۰ سال قرار داشتند. پس از کسب رضایت از افراد، ۵ ml خون وریدی از هر یک از آن‌ها گرفته شد. نمونه‌های خون جهت آزمایش مولکولی به لوله مخصوص حاوی EDTA ریخته شده و پلاسمای آنها پس از سانتریفیوژ با دور  $\times g$  ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه از رسوب گلبول‌های قرمز و سفید خون جدا شد و در دمای  $^{\circ}C$  -۷۰ تا زمان مناسب نگهداری گردید. این

اندام‌های مختلف مانند ریه‌ها، کلیه‌ها، روده، سیستم گوارشی و سیستم عصبی شده و گاه منجر به مرگ می‌گردد.<sup>۳</sup> تنوع پاسخ‌های ایمنی و به تبع آن علائم بیماری در افراد مبتلا به کووید-۱۹ پژوهشگران را به بررسی نقش سیستم ایمنی در نوع و شدت علائم بالینی این بیماری سوق داده است. درک نقش واریانت‌های ژنتیکی در سیر عفونت‌های تنفسی می‌تواند به شناسایی کاندیداهای احتمالی برای تجزیه و تحلیل بیشتر در بیماران مبتلا به SARS-CoV-2 کمک کند، با این حال، داده‌های مربوط به پلی مورفیسیم ژن‌های سایتوکین در عفونت SARS-CoV-2 خیلی محدود است.<sup>۴</sup>

در مطالعه ژنومی گسترده‌ای که اخیراً در انگلستان بین ۲۲۴۴ نفر از افراد با بیماری حاد کووید-۱۹ انجام شده، ژن‌هایی شناسایی شده‌اند که با شدت بیماری کووید-۱۹ در بیماران در ارتباط بودند. از میان آنها می‌توان به ژن‌های دخیل در پاسخ دفاعی ضدویروسی مانند ژن زیرواحد ۲ گیرنده اینترفرون  $\alpha/\beta$  (IFNAR2) اشاره کرد.<sup>۵</sup> گیرنده اینترفرون نوع ۱ (IFN1) بر روی همه انواع سلولی به‌عنوان یک کمپلکس هترودیمری بیان می‌شود و دارای درجه بالایی از انعطاف‌پذیری است که قادر به تشخیص مجموعه‌ای از زیرگروه‌های اینترفرون نوع ۱ ( $IFN-\alpha/\beta$ ) و ویژگی اثرگذاری مانند سایر ژن‌های پلی‌تروپیک (Pleiotropic) است. در این کمپلکس رسپتور، دو عضو از ابرخانواده گیرنده‌های سایتوکین، IFNAR1 و IFNAR2، به اتصال لیگاند و فعال‌سازی مسیرهای مولکولی مرتبط کمک می‌کنند.<sup>۶</sup> IFNAR2 (اینترفرون آلفا و گیرنده بتا زیرواحد ۲) یک ژن کدکننده پروتیین است که بر روی کروموزوم ۲۱ و در جایگاه q22.11 واقع شده است. بیماری‌های مرتبط با IFNAR2 شامل نقص ایمنی ۴۵ و نقص ایمنی اولیه با عفونت ویروسی پس از واکسیناسیون سرخک-اوریون-سرخچه می‌باشد. بنابراین، کمبود IFNAR2 باعث حساسیت کشنده به واکسن‌های ویروسی زنده می‌شود و نقش حیاتی اما محدود IFN-alpha/beta را در ایمنی ویروسی نشان می‌دهد.<sup>۷</sup> پاسخ‌های موثر ضدویروسی با واسطه IFN1، برای پاکسازی ویروسی حیاتی است. SARS-CoV-2 با القای IFN های نوع ۱ مقابله کرده و از طریق پروتیین‌های ساختاری، پاسخ‌های IFN را مهار می‌کند.<sup>۸</sup> مطالعات مختلف ارتباط ژن IFNAR2 را با شدت بیماری در عفونت کروناویروس نشان داده و ارتباط گوناگونی‌های ژنومی، یعنی پلی مورفیسیم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) را تایید کرده‌اند. با این

(Multivariate logistic regression) با استفاده از آزمون Hosmer-Lemeshow انجام شد. P-value دو طرفه کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها با استفاده از SPSS software, version 22 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## یافته‌ها

مشخصات دموگرافیک شرکت‌کنندگان در آزمایش: به‌طور کلی ۹۵۴ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ وارد این آزمایش شدند که میانگین سنی آنها در گروه بهبود یافته  $56/24 \pm 12/01$  سال و در گروه فوت‌شده  $53/68 \pm 11/66$  سال بود. تعداد ۵۲۸ نفر (۵۵/۳۵٪) بهبود یافته و ۴۲۶ نفر (۴۴/۶۵٪) جان خود را از دست دادند. فراوانی جنسیتی در این افراد به‌صورت ۴۴۹ زن (۴۷٪) و ۵۰۵ مرد (۵۳٪) بود. در بین افرادی که بیماری آنها بهبود پیدا کرد، ۲۲۳ زن (۴۲٪) و ۳۰۵ مرد (۵۸٪) وجود داشت. افراد فوت شده نیز شامل ۲۲۶ زن (۵۳٪) و ۲۰۰ مرد (۴۷٪) بودند (جدول ۱).

بررسی باندهای حاصل از هضم آنزیمی: باندهای حاصل از هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفته و ژنوتایپ هر فرد براساس الگوی باندها مشخص شد. در شکل ۱ نمونه‌ای از ژنوتایپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم rs2236757 در ژن نشان داده شده است. در این شکل ستون شماره ۲ نمونه کنترل بدون هضم آنزیمی است که یک باند با سایز ۴۶۲ bp را نشان می‌دهد. ستون ۳ دارای دو باند با سایزهای ۳۴۹ bp و ۱۱۳ bp است که ژنوتایپ هموزیگوت (AA) (وحشی) را نشان می‌دهد. همچنین ستون ۴ دارای سه باند ۱۸۵ bp، ۱۶۴ bp و ۱۱۳ bp است که نشان‌دهنده ژنوتایپ هموزیگوت (GG) (موتانت) می‌باشد. در نهایت ستون ۵ با داشتن ۴ باند نشان‌دهنده ژنوتایپ هتروزیگوت AG می‌باشد.

فراوانی ژنوتیپی و آلیلی ژن IFNAR2: فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم rs2236757 در ژن IFNAR2 محاسبه شد و نتایج حاصل نشان داد که به‌طور کلی ۲۱٪ موارد ژنوتیپ AA، ۴۷٪ ژنوتیپ GA و ۳۲٪ ژنوتیپ GG داشتند. به تفکیک شدت بیماری، ۲۴٪ افراد بهبود یافته دارای ژنوتیپ AA، ۵۴٪ ژنوتیپ GA و ۲۲٪ ژنوتیپ GG بودند. از طرفی در افرادی که جان خود را از دست داده بودند، ۱۶٪

پژوهش در کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران مورد بررسی قرار گرفت و با کد اخلاق IR.PII.REC.1400.042 به تصویب آن کمیته رسید.

استخراج DNA و بررسی پلی‌مورفیسم: DNA بیماران مبتلا به عفونت COVID-19 با استفاده از کیت استخراج DNA (Yekta Tajhiz Azma, Iran) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. سپس کمیته و کیفیت DNA استخراج شده به‌ترتیب با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. ازدیاد ناحیه حاوی پلی‌مورفیسم مورد نظر، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. توالی پرایمرها شامل 5'-GCTAGACTAGATGTCATGGT-3' به‌عنوان پرایمر پیشرو و 5'-GCTTGCCCTCAGAGTAAA-3' به‌عنوان پرایمر برگشتی بود که یک قطعه ۴۶۲ جفت بازی را تکثیر می‌کردند. پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی rs2236757 در ژن IFNAR2 با استفاده از سنجش RFLP و آنزیم Cac8I بررسی شد. هضم آنزیمی در حجم ۲۰ ml شامل ۲ ml محصول PCR، ۰/۲ ml آنزیم، ۲ ml بافر 10X و ۱۵/۸ ml آب مقطر، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انجام شد. سپس غیرفعال کردن آنزیم به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  انجام شد. برای مشاهده الگوی حاصل، از الکتروفورز در ژل آگارز در بافر TBE 1X، به‌مدت ۴۰ دقیقه در ولتاژ ۷۰، استفاده شد و با استفاده از سایبرگرین رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت ژل‌ها با استفاده از (Gel documentation device, UVP BioDoc-It2, Cole Parmer@, Germany) از آنالیز پلی‌مورفیسم‌ها استفاده شد. نمونه‌های دارای قطعات ۱۱۳ و ۳۴۹ جفت بازی به‌عنوان ژنوتیپ وحشی هموزیگوت (AA)، نمونه‌های دارای قطعات ۱۱۳، ۱۶۴ و ۱۸۵ جفت بازی به‌عنوان ژنوتیپ موتانت هموزیگوت (GG) و نمونه‌های دارای قطعات ۱۱۳، ۱۶۴، ۱۸۵ و ۳۴۹ جفت بازی به‌عنوان ژنوتیپ هتروزیگوت در نظر گرفته شدند. برای ارزیابی نرمال بودن داده‌های متغیرهای پیوسته از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد.

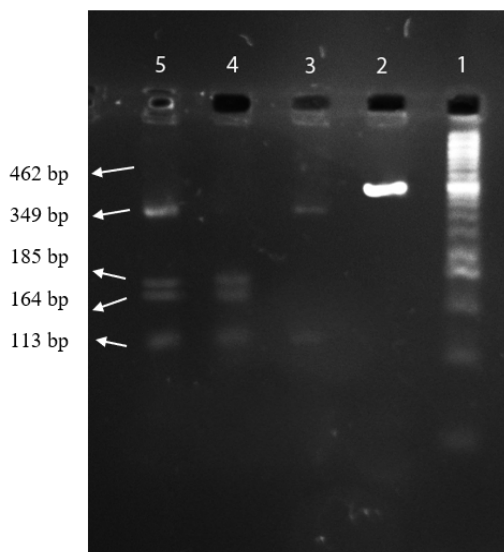
همچنین از Chi-square test و Mann-Whitney U test به‌ترتیب برای ارزیابی متغیرهای کمی و متغیرهای پیوسته استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل ارتباط عوامل خطر برای مقاومت و حساسیت به COVID-19، تجزیه و تحلیل رگرسیون لجستیک چندمتغیره

جدول ۱: مشخصات دموگرافیک بیماران فوت شده ناشی از ابتلا به کوید-۱۹ و بهبودیافتگان از کوید-۱۹

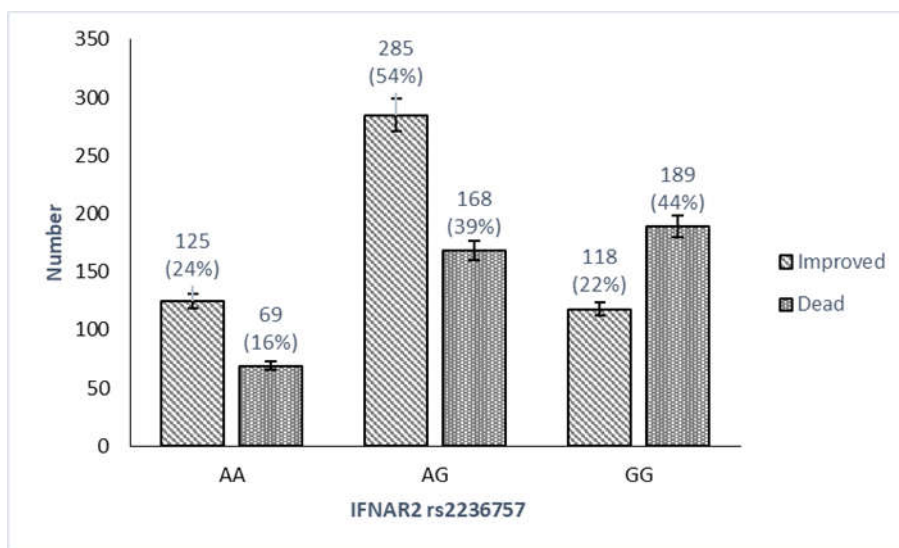
| ویژگی | بهبود یافته                    | فوت شده                        |
|-------|--------------------------------|--------------------------------|
| تعداد | ۵۲۸ نفر (۰/۵۵/۳۵)              | ۴۲۶ نفر (۰/۴۴/۶۵)              |
| سن    | ۵۶/۲۴±۱۲/۰۱                    | ۵۳/۶۸±۱۱/۶۶                    |
| جنسیت | زن ۲۲۳ (۰/۴۲) / مرد ۳۰۵ (۰/۵۸) | زن ۲۲۶ (۰/۵۳) / مرد ۲۰۰ (۰/۴۷) |

جدول ۲: بررسی تاثیر پلی مورفیسم rs2236757 در ژن IFNAR2 در شدت بیماری کوید-۱۹

| Model        | Genotype | Covid-19 = Improved       | Covid-19 = Dead | OR (95% CI)      | P       | AIC    | BIC    |
|--------------|----------|---------------------------|-----------------|------------------|---------|--------|--------|
| Codominant   | G/G      | ۱۱۸ (۰/۲۲/۴) ۲۸۵ (۰/۵۴)   | ۱۸۹ (۰/۴۴/۴)    | ۱/۰۰             | <۰/۰۰۰۱ | ۱۲۵۴/۸ | ۱۲۷۴/۳ |
|              | A/G      | ۱۲۵ (۰/۲۳/۷)              | ۱۶۸ (۰/۳۹/۴)    | ۰/۳۶ (۰/۲۷-۰/۴۹) |         |        |        |
|              | A/A      |                           | ۶۹ (۰/۱۶/۲)     | ۰/۳۳ (۰/۲۳-۰/۴۹) |         |        |        |
| Dominant     | G/G      | ۱۱۸ (۰/۲۲/۴) ۴۱۰ (۰/۷۷/۷) | ۱۸۹ (۰/۴۴/۴)    | ۱/۰۰             | <۰/۰۰۰۱ | ۱۲۵۳   | ۱۲۶۷/۶ |
|              | A/G-A/A  |                           | ۲۳۷ (۰/۵۵/۶)    | ۰/۳۵ (۰/۲۷-۰/۴۷) |         |        |        |
| Recessive    | G/G-A/G  | ۴۰۳ (۰/۷۶/۳) ۲۸۵ (۰/۵۴)   | ۳۵۷ (۰/۸۳/۸)    | ۱/۰۰             | ۰/۰۰۲۸  | ۱۲۹۷/۶ | ۱۳۲/۱  |
|              | A/A      |                           | ۶۹ (۰/۱۶/۲)     | ۰/۶۱ (۰/۴۴-۰/۸۵) |         |        |        |
| Overdominant | G/G-A/A  | ۲۴۳ (۰/۴۶)                | ۲۵۸ (۰/۶۰/۶)    | ۱/۰۰             | <۰/۰۰۰۱ | ۱۲۸۶/۷ | ۱۳۰۱/۳ |
|              | A/G      | ۲۸۵ (۰/۵۴)                | ۱۶۸ (۰/۳۹/۴)    | ۰/۵۶ (۰/۴۳-۰/۷۲) |         |        |        |
| Log-additive | ---      | ---                       | ---             | ۰/۵۴ (۰/۴۵-۰/۶۶) | <۰/۰۰۰۱ | ۱۲۶۴/۳ | ۱۲۷۸/۹ |



شکل ۱: بررسی الگوی باندهای حاصل از هضم آنزیمی پلی مورفیسم rs2236757 در ژن IFNAR2 به وسیله آنزیم Cac8I (۱: مارکر مولکولی ۱۰۰۰ bp، ۲: نمونه کنترل، ۳: هموزیگوت وحشی، ۴: هموزیگوت موتانت، ۵: هتروزیگوت)



شکل ۲: مقایسه فراوانی هریک از ال‌های مورد بررسی در IFNAR2 rs2236757 ژن بین دو گروه بیماران بهبودیافته و فوت‌شده ناشی از ابتلا به کوید-۱۹. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم rs2236757 ژن IFNAR2، در گروه بیماران بهبودیافته فراوانی ژنوتیپ AA ۲۴٪، ژنوتیپ AG ۵۴٪ و ژنوتیپ GG ۲۲٪ بود. در مقابل در گروه بیماران فوت شده فراوانی ژنوتیپ AA ۱۶٪، ژنوتیپ AG ۳۹٪ و ژنوتیپ GG ۴۴٪ بود.

## بحث

به نظر می‌رسد پلی‌مورفیسم در IFNAR2 (rs2236757) تنوع تکنوکلوتیدی A/G در ژن IFNAR2 در کروموزوم ۲۱ در آمریکای لاتین و اروپا بسیار شایع بوده و موارد افزایش یافته SARS-CoV-2 را نشان می‌دهد. در مقابل، به نظر می‌رسد پلی‌مورفیسم در IFN $\beta$  (rs2071430) تنوع تکنوکلوتیدی G/T در ژن MX1 در کروموزوم ۲۱ در آفریقا و آسیا در مقایسه با مناطق اروپایی و آمریکایی شایعتر باشد. روند مشابهی برای IL1-RN (rs315952) تنوع تکنوکلوتیدی T/C در ژن IL1RN روی کروموزوم ۲ و برای IL-4 (rs2070874) تنوع تکنوکلوتیدی C/T در ژن IL4 در کروموزوم ۵ مشاهده شده است. این یافته‌ها می‌تواند نشان‌دهنده ارتباط چندشکلی ژن‌های کلیدی سابتوکین در سیر کوید-۱۹ و همچنین انعطاف‌پذیری و غلبه SARS-CoV-2 در مناطق خاصی از جهان باشد. بنابراین، عوامل ژنتیکی می‌توانند در کنار سایر عوامل اجتماعی و اقتصادی، در تداوم عفونت SARS-CoV-2 در قاره آمریکا نقش داشته باشند و باید به فراوانی و توزیع آن در سراسر جهان توجه شود.<sup>۹</sup> در تحقیق حاضر

ژنوتیپ AA، ۳۹٪ ژنوتیپ GA و ۴۴٪ ژنوتیپ GG مشاهده شد (شکل ۲). بررسی فراوانی آلی پلی‌مورفیسم rs2236757 در ژن IFNAR2 در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که ۵۶٪ موارد دارای آلل G و ۴۴٪ دارای آلل A بودند. در افراد بهبود یافته این نسبت به ترتیب ۴۹ و ۵۱٪ برای آلل G و A و در افراد فوت شده به ترتیب ۶۴ و ۳۶٪ برای آلل G و A بود. بررسی تاثیر پلی‌مورفیسم ژن IFNAR2 در شدت کوید-۱۹ در بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs2236757 در ژن IFNAR2 با شدت بیماری کوید-۱۹، مقدار OR برای ژنوتیپ GG برابر با ۱ بود که نشان‌دهنده عدم نقش این پلی‌مورفیسم در شدت بیماری می‌باشد.

از طرفی آلل A در افراد بهبود یافته به‌طور معناداری بیشتر از افراد فوت شده بود و مقدار  $OR < 1$  نیز این مساله را تایید نمود که آلل وحشی A می‌تواند موجب کاهش علائم بیماری شود (جدول ۲). بررسی نقش پلی‌مورفیسم rs2236757 در ژن IFNAR2 با شدت بیماری کوید-۱۹ در جمعیت زنان و مردان مورد مطالعه نشان داد که تفاوت آماری معناداری از این نظر بین زنان و مردان وجود ندارد ( $P = 0/71$ ).

این جهش‌یافته‌ها در ناحیه کدکننده و غیرکدکننده ژن IFNAR2 می‌توانند به تشخیص بیماری شدید ناشی از کووید ۱۹ کمک کنند و در نتیجه به تولید داروی مؤثر علیه عفونت کمک کنند.<sup>۱۱</sup> در تحقیق حاضر یک SNP متفاوت نسبت به تحقیق مذکور مطالعه شد و نتایج حاصل نشان‌دهنده نقش حفاظتی آن در برابر کووید-۱۹ بود. این یافته‌ها با نتایج تحقیق مذکور منافاتی نداشته و نشان‌دهنده تفاوت نقش انواع مختلف واریانت‌های ژنتیکی در شدت بیماری می‌باشد.

استفاده از گلوکوکورتیکوئیدها نتایج متناقضی برای درمان سندرم دیسترس تنفسی حاد (ARDS) به‌همراه داشته است. در یک مطالعه ارتباط بیماری جدید از پلی مورفیسیم rs9984273 گزارش شد که در ژن گیرنده اینترفرون آلفا/بتا (IFNAR2) در ناحیه‌ای مربوط به یک موتیف اتصال گیرنده گلوکوکورتیکوئید (GR) قرار دارد. آلل مغلوب rs9984273 با بیان IFNAR بالاتر، سطوح پایین‌تر IFN- $\gamma$  و IL-6 و شکل کمتر شدید بیماری کووید-۱۹ و نتیجه بهتر در بیماران تحت درمان با اینترفرون بتا مبتلا به ARDS مرتبط بود. بررسی فراوانی این SNP در مطالعات بالینی می‌تواند نتایج متناقض مطالعات ARDS و پیامدهای متعدد در COVID-19 را در مورد سیگنالینگ IFN نوع I و گلوکوکورتیکوئیدها توضیح دهد.<sup>۱۱</sup> در تحقیق حاضر به بررسی فراوانی پلی مورفیسیم دیگر (rs2236757) در ژن IFNAR2 پرداخته شد تطبیق نتایج به‌دست آمده با پیامد بالینی ابتلا به کووید-۱۹ در بیماران نشان داد که حضور این پلی مورفیسیم با شدت کمتر بیماری کووید-۱۹ همراه است. در تحقیق حاضر فراوانی پلی مورفیسیم rs2236757 در ژن IFNAR2 در افراد مبتلا به کووید-۱۹ و ارتباط آن با شدت بیماری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که rs2236757 در ژن IFNAR2 با کاهش شدت بیماری در ارتباط است. پس از گذشت دو سال همچنان بیماری کووید-۱۹ از مسائل بهداشتی مهم در جهان محسوب می‌شود و شناخت نقش واریانت‌های ژنتیکی در پاسخ به درمان از اهمیت بسیاری برخوردار است. لذا امید می‌رود که مطالعات در این زمینه افزایش یافته و مکانیسم‌های دخیل در تفاوت در شدت بروز بیماری و پاسخ به درمان مشخص گردد.

سپاسگزاری: این مقاله دستاورد پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی همبستگی بین میزان فراوانی پلی مورفیسیم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن IFNAR2 با شدت بیماری کووید-۱۹" که بخشی از طرح پژوهشی مصوب انستیتو پاستور ایران در سال ۱۴۰۲ به کد

مشخص گردید که rs2236757 در ژن IFNAR2 با کاهش شدت بیماری در ارتباط است. این مساله نشان‌دهنده نقش مهم ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های التهابی و همچنین نقش واریانت‌های ژنتیکی این ژن‌ها در شدت بیماری کووید-۱۹ می‌باشد.

با توجه به پلی مورفیسیم‌های سایتوکین و ارتباط آنها با عفونت‌های SARS-CoV-1 و SARS-CoV-2، مطالعه‌ای که توسط Lau و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد، ارتباط بین پلی مورفیسیم IFN- $\gamma$  با این بیماری را تأیید کرد. در یک مطالعه اخیر که توسط Pairo-Castineira و همکاران انجام شد، براساس مطالعات همبستگی گسترده ژنوم (GWAS) و GenOMICC (ژنتیک مرگ‌ومیر در مراقبت‌های حیاتی)، کل ژنوم بیماران آلوده به SARS-CoV-2 را در حالت شدید پوشش داد و امکان کشف مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیکی کاملاً جدید را فراهم کرد. در این تحقیق، تعداد ۲۲۴۴ بیمار بدحال مبتلا به کووید-۱۹ که در مراقبت‌های درمانی (ICU) در انگلستان بستری شده بودند، تحت بررسی قرار گرفتند. با تأیید فرضیه قبلی، تجزیه و تحلیل پلی مورفیسیم‌ها در ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های ضدویروسی به اهمیت گیرنده اینترفرون IFNAR2 (rs2236757; chr21q22.1) و ژن‌های Oligoadenylate Synthetase (OAS) در COVID-19 اشاره کرد. تصادفی‌سازی مندلی نشان داد که وجود پلی مورفیسیم‌های مرتبط با بیان بیش از حد IFNAR2 شانس ابتلا به کووید-۱۹ شدید تهدیدکننده زندگی را کاهش می‌دهد.<sup>۱۱</sup> به‌طور مشابهی در تحقیق حاضر نیز نشان داده شد که پلی مورفیسیم rs2236757 در این ژن می‌تواند با بهبود کووید-۱۹ مرتبط باشد.

در یک مطالعه، Akter و همکاران کدگذاری SNP (nsSNPs) ژن IFNAR2 را با استفاده از ابزارهای مختلف بیوانفورماتیک مشخص کرده و SNP های مضر را شناسایی کردند. آنها ۹ nsSNP را به‌عنوان بیماری‌زا و بیماری‌زا همراه با کاهش پایداری پروتیین پیدا کرده و از تجزیه و تحلیل داکینگ مولکولی استفاده کردند تا ۵ nsSNP برای کاهش میل اتصال به IFN را نشان دهند. شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی نشان داد که جهش یافته P136R می‌تواند اتصال حیاتی با مولکول IFN را در پاسخ به COVID-19 بی‌ثبات کند. بنابراین، احتمالاً تأثیر زیادی در اختلال در ساختار پروتیین IFNAR2 دارد. SNP های sQTL و eQTLs به‌طور بالقوه کاهش تولید IFNAR2 را که منجر به بیماری‌های شدید می‌شود توضیح می‌دهند.

ایران که در اجرای مراحل این پایان‌نامه از حمایت و کمک‌های بی‌دریغشان بهره بردم صمیمانه سپاسگزارم.

IR. PII.REC.1400.042 می‌باشد که با حمایت انستیتو پاستور ایران اجرا شده است. از تمامی پرسنل بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور

## References

- Lai C-C, Shih T-P, Ko W-C, Tang H-J, Hsueh P-R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International journal of antimicrobial agents* 2020;55(3):105924.
- Organization WH. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 51. 2020.
- Singhal T. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *The indian journal of pediatrics* 2020;87(4):281-6.
- Paim AAO, Lopes-Ribeiro A, e Silva DSD, Andrade LAF, Moraes TF, Barbosa-Stancioli EF, et al. Will a little change do you good? A putative role of polymorphisms in COVID-19. *Immunology Letters* 2021;235:9-14.
- Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in Covid-19. *Nature* 2020.
- Ragimbeau J, Dondi E, Alcover A, Eid P, Uzé G, Pellegrini S. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *The EMBO journal* 2003;22(3):537-47.
- Maduemem K, Dumitrescu A. G56 Novel primary immunodeficiency?: cases of interferon-alpha/beta receptor 2 deficiency. *BMJ Publishing Group Ltd* 2018.
- Velavan TP, Pallerla SR, Rüter J, Augustin Y, Kreamsner PG, Krishna S, et al. Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. *EBioMedicine* 2021;72:103629.
- Chaudhary M. COVID-19 susceptibility: potential of ACE2 polymorphisms. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2020;21(1):1-8.
- Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature* 2021;591(7848):92-8.
- Akter S, Roy AS, Tonmoy MIQ, Islam MS. Deleterious single nucleotide polymorphisms (SNPs) of human IFNAR2 gene facilitate COVID-19 severity in patients: a comprehensive in silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2021:1-17.
- Jalkanen J, Khan S, Elima K, Huttunen T, Wang N, Hollmén M, et al. Polymorphism in IFNAR contributes to glucocorticoid response and outcome in ARDS and COVID-19. *medRxiv* 2022.

## Investigating the correlation between the frequency of single nucleotide polymorphisms in the IFNAR2 gene with the severity of the Covid-19 disease

Mahnaz Safari M.Sc.<sup>1</sup>  
Pooneh Rahimi Ph.D.<sup>2\*</sup>  
Akram Sadat Tabatabaee  
Bafroee Ph.D.<sup>1</sup>

1- Department of Biology, East  
Tehran Branch, Islamic Azad  
University, Tehran, Iran.

2- Department of Hepatitis and  
AIDS, and Blood Borne Diseases,  
Pasteur Institute of Iran, Tehran,  
Iran.

\* Corresponding author: Department of  
Hepatitis and AIDS and Blood Borne  
Diseases, Pasteur Institute of Iran, 12  
Farvardin Ave., Enghelab Sq., Tehran,  
Iran.  
Tel: +98-21-66969291  
E-mail: Pooneh5376@yahoo.com

### Abstract

Received: 26 Aug. 2023 Revised: 03 Sep. 2023 Accepted: 15 Oct. 2023 Available online: 23 Oct. 2023

**Background:** Understanding the complex processes of the immune system in dealing with the covid-19 infection, which is probably related to polymorphisms in cytokine and chemokine genes, can explain the pro-inflammatory condition of patients. Accordingly, in the present study, the correlation between the frequency of single nucleotide polymorphisms in the pro-inflammatory IFNAR2 gene and the severity of the disease of COVID-19 was investigated.

**Methods:** This research was reviewed by the ethics committee of the Pasteur Institute of Iran and was approved by this committee with the ethics code IR.PII.REC.1400.042. and continued from December 2021 to November 2022. This study was conducted on 954 patients with COVID-19, who were divided into two groups: those who recovered and those who died. COVID-19 infection in all 954 volunteers has been confirmed through rtReal Time-PCR of oropharyngeal or nasopharyngeal swabs. After taking blood samples from patients and extracting DNA, IFNAR2 gene was amplified using specific primers. Then RFLP method and Cac8I restriction enzyme were used to investigate rs2236757 polymorphisms in IFNAR2 gene. Genotype of people was determined according to the pattern of formed bands. The results were statistically analyzed using SPSS software.

**Results:** Calculation of genotypic frequency of rs2236757 polymorphism in IFNAR2 gene showed that in general 21% of cases had AA genotype, 47% GA genotype and 32% GG genotype. The allelic frequency of this polymorphism showed that 56% of cases had G allele and 44% had A allele. In investigating the correlation of rs2236757 polymorphism in IFNAR2 gene with the severity of the disease of Covid-19, the OR value for the GG genotype was equal to 1, which indicates the absence of the role of this polymorphism in the severity of the disease. On the other hand, A allele was significantly more in recovered people than in deceased people, and the value of OR<1 also confirmed this issue.

**Conclusion:** The results showed that rs2236757 in the IFNAR2 gene is related to the reduction of disease severity, which indicates the important role of genes related to inflammatory responses, as well as the role of genetic variants of these genes in the severity of COVID-19.

**Keywords:** COVID-19, cytokine storm, inflammation, single nucleotide polymorphism.

