مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های STAT4, IL7R,FOXP1 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در شمال غرب ایران

الیناز اکبری آذر[۱]، سیدعبدالحمید انگجی*[۲]، پرویز پاکزاد[۳]، عیسی عبدی‌راد[۴]، آرش موسی‌الرضایی[۵]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۰۳/۰۴

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: مولتیپل اسکلروزیس (MIM # 126200) (MS) نوعی اختلال دمیلینه کننده التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که به‌عنوان شایع‌ترین علت ناتوانی عصبی غیر ترومایی در بالغین جوان شناخته می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی ارتباط واریانت‌های rs9828629 (FOXP1 gene), rs9967792 (STAT4 gene), rs6881706 (IL7R gene) با مالتیپل اسکلروزیس عودکننده _فروکش‌کننده Relapsing-Remitting MS(RRMS) هست.

مواد و روش کار: مطالعه مورد شاهدی شامل ۱۲۹ مورد مبتلا به RRMS و ۲۰۰ فرد سالم می‌باشد. با استفاده از تکنیک ARMS-PCR ژنوتایپ هرکدام از پلی‌مورفیسم‌های rs9828629, rs6881706, rs9967792 تعیین شد. مربع کای، آزمون دقیق فیشر Fisher's exact test و آنالیز رگرسیون اللی و ژنوتیپی برای بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های موردنظر با بیماری RRMS استفاده شد.

یافته‌ها: با توجه به کل جمعیت بررسی‌شده ،ارتباط معنی‌داری بین rs6881706 و RRMS با OR= ۲/۵۲۲ و ۴/۷۵۹ -۱/۳۳۶ =95%CI و P_Value=۰/۰۰۴ مشاهده شد. پس از استفاده از تصحیح Bonferroni (P = ۱/۰۱۶۹) ارتباط این پلی‌مورفیسم با RRMS تغییر نکرد. اما هیچ ارتباطی بین rs9828629 و rs9967792 با RRMS مشاهده نشد. در بررسی ارتباط rs6881706 با RRMS در دو زیرگروه زن و مرد هیچ تفاوتی بین OR کل و OR زیرگروه‌ها مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر سه مورد از پلی‌مورفیسم‌های مرتبط با مالتیپل اسکلروزیس حاصل از مطالعه ارتباط در سطح کل ژنوم (GWAS)در جمعیت اروپایی را در جمعیت شمال غرب ایران بررسی کرده است. بین پلی‌مورفیسم rs6881706 و بیماری RRMS ارتباط معنی‌دار مشاهده شد ولی بین پلی‌مورفیسم‌های rs9967792 و rs9828629 با بیماری RRMS ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. اهمیت پلی‌مورفیسم‌های تأییدشده برای درک مسیرهای سیگنالینگ در بیماری RRMS و استفاده از آن‌ها به‌عنوان یک بیومارکرژنتیکی در تشخیص و غربالگری بیماری و ایجاد هدف جدید دارویی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: مالتیپل اسکلروزیس عودکننده _فروکش‌کننده، پلی‌مورفیسم، STAT4, IL7R,FOXP1

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره چهارم، ص ۲۸۹-۲۸۰، تیر ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: تهران، خیابان مفتح، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی، تلفن: ۰۲۱۹۶۶۶۴۵۵۰

Email: angaji@khu.ac.ir

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری مزمن اتوایمیون سیستم عصبی مرکزی است که با التهاب و دمیلینه شدن و دژنراسیون اولیه و ثانویه آکسونی مشخص می‌شود(۱). این بیماری به علت ایجاد بافت‌های اسکار ناشی از میلین آسیب‌دیده و متعاقب آن درگیر شدن اندام‌ها و ارگان‌های مختلف بدن به خاطر اختلال در انتقال پیام‌های عصبی مالتیپل اسکلروزیس نامیده می‌شود(۲، ۳) بر اساس سیر بیماری و بروز علائم مالتیپل اسکلروزیس به انواع مختلفی تقسیم می‌شود: ۱.عودکننده _فروکش‌کننده[1] ۲.پیش‌رونده اولیه

[۱] دانشجوی دکتری ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

[۲] دانشیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

[۴] استاد، گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۵] استادیار، گروه نورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[1] Relapsing-Remitting

۳.پیش‌رونده ثانویه [۲] ۴.عودکننده_پیش‌رونده[۳] (۴) در بین این چند نوع مالتیپل اسکلروزیس الگوی عودکننده _فروکش‌کننده و پیش‌رونده ثانویه شایع‌ترین می‌باشند(۵) پزشکان به‌غیراز این چهار نوع مالتیپل اسکلروزیس ، نوع خفیفی از این بیماری را شناسایی کرده‌اند به نام حسی خوش‌خیم که افراد مبتلا به این نوع از بیماری دچار حملاتی می‌شوند که فقط باعث از دست رفتن بینایی و یا حس‌های دیگر می‌شود و این علائم معمولاً موقتی بوده و به‌ندرت باعث بروز ناتوانی‌های دائمی می‌شود(۶).

بیماری مالتیپل اسکلروزیس یکی از شایع‌ترین علل ناتوانی نورولوژیکی غیر ترومایی در بین جوانان می‌باشد و بیشتر در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی تشخیص داده می‌شود ولی تظاهرات اولیه می‌تواند قبل از ۱۰ سالگی یا بعد از ۶۰ سالگی هم دیده شود. بیش از ۲،۵ میلیون فرد مبتلا در دنیا وجود دارد و مطالعات آماری نشان می‌دهند که نسبت زنان مبتلا به مردان مبتلا بیشتر بوده و حدود ۲ به ۱ می‌باشد(۷، ۸).

تاکنون علت اصلی مالتیپل اسکلروزیس شناخته نشده است ولی اعتقاد بر این است که عوامل ژنتیکی و محیطی هر دو باهم مسبب این بیماری هستند. با وجودیکه مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری توارثی نیست اما تعدادی از واریانت‌های ژنتیکی مسئول افزایش ریسک ابتلا به این بیماری هستند. همچنین در خویشاوندان درجه‌یک بیمار مبتلا ۱ الی ۳ درصد احتمال ایجاد بیماری وجود دارد. مطالعات دوقلوها میزان هماهنگی بالایی در حدود ۲۵-۳۰درصد در دوقلوهای مونوزایگوت و ۵درصد در دوقلوهای دی زایگوت را نشان می‌دهد و این ثابت می‌کند که ژنتیک یک عامل قوی در این بیماری می‌باشد(۹). شیوع متنوعی از مالتیپل اسکلروزیس در نواحی مختلف از دنیا وجود دارد و بالاترین شیوع آن در اروپا و آمریکای شمالی گزارش شده است(۱۰، ۱۱). ایران اکنون به‌عنوان یک ناحیه با شیوع بالای این بیماری شناخته شده است برخلاف فرضیه ۱۵ سال پیش که ایران را به‌عنوان منطقه‌ای با شیوع کمتر از ۵ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر معرفی می‌کرد(۱۲، ۱۳). در ایران و در شهر تهران شیوع مالتیپل اسکلروزیس حدود ۵۱،۹ در ۱۰۰۰۰۰ نفر و در اصفهان به ۷۱ مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر و در شهر کرمان ۵۷،۳ در ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش شده است(۱۴). در کل شیوع مالتیپل اسکلروزیس در ایران در محدوده ۷،۴ تا ۸۹ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در استان‌های مختلف کشور می‌باشد(۱۵). از طرفی ایران بیشترین شیوع این بیماری را در خاورمیانه و آسیا دارد(۱۶). ایران در ۴ دهه گذشته شاهد افزایش قابل‌توجهی در مهاجرت بوده است و درنتیجه در مطالعات مختلفی که در کشورهای مختلف دنیا در زمینه شیوع مالتیپل اسکلروزیس صورت گرفته شاهد مطالعاتی هستیم که در بین ایرانیان مهاجر مبتلا به این بیماری صورت گرفته است(۱۷). در بررسی که توسط نصر و همکاران بر روی مطالعات انجام‌گرفته در سوئد و نروژ و انگلیس و هند صورت گرفته مشخص‌شده که شیوع مالتیپل اسکلروزیس در مهاجران ایرانی کشورهای ذکرشده در مقایسه با مردم بومی بیشتر می‌باشد(۱۸).

در مطالعاتی که در زمینه مطالعه ارتباط ژن کاندید در بیماری مالتیپل اسکلروزیس صورت گرفته فرکانس اللی و ژنوتیپی مارکرها مخصوصاً پلی‌مورفیسم‌ها بین بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس غیر خویشاوند و افراد کنترل سالم باهدف شناسایی تفاوت‌های مهم و مشخص بین دو گروه ذکرشده جهت ارتباط دادن با بیماری مقایسه شده‌اند و اعتقاد بر این است که مطالعات ژن کاندید با پلی‌مورفیسم‌ها توانایی بیشتری در تشخیص الل‌های شایع با یک اثر میانه بر روی احتمال بیماری نسبت به مطالعات پیوستگی دارند به شرطی که ژن‌های کاندید مناسبی برای بررسی انتخاب شوند(۱۹) ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های FOXP1 و IL7R و STAT4 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در مطالعات گذشته بررسی شده و بعضی از مطالعات ارتباط قوی با MS را نشان داده‌اند و برخی دیگر هیچ ارتباطی نشان نداده‌اند. ژن STAT4 یک فاکتور رونویسی را رمزگذاری می‌کند که می‌تواند توسط اینترلوکین 12- (IL) و IL-23 فعال شود و در سیگنالینگ از طریق گیرنده اینترفرون نوع یک (IFN1)نقش مهمی دارد. همچنین STAT4 برای هدایت سیگنال سایتوکاینهای پیش التهابی مختلفی مانند IL-12 و IL-23 و IL-15 و افزایش تولید اینترفرون گاما ضروری می‌باشد لذا در پلاریزاسیون و تداوم پاسخ ایمنی سلولی Th1 نقش مهمی ایفا می‌کند. همچنین فاکتور رونویسی کد شده توسط ژن STAT4 در تکامل سلول‌های Th17 که نقش اساسی در التهاب مرتبط با خودایمنی دارند مؤثر می‌باشد(۲۰). از طرفی درگیری گسترده اینترفرون‌های نوع یک و دو در پاتوژنز MS، STAT4 را به یک منطقه کاندیدای واضح برای بررسی استعداد ژنتیکی ابتلا به این بیماری تبدیل کرده است.

گیرنده اینترلوکین ۷، پروتئینی واقع در سطح سلول‌های ایمنی است که از دو زیر واحد، گیرنده اینترلوکین ۷ آلفا (CD127) و گیرنده‌های زنجیره مشترک گاما (CD132) تشکیل شده است. گیرنده‌های زنجیره‌ای مشترک گاما با سیتوکین های مختلفی از جمله اینترلوکین ۲، ۴، ۹ و ۱۵ مشترک است. (۲۱). مطالعات آنالیز ارتباط در سطح ژنوم متعددی تاکنون صورت گرفته که در آن‌ها به ارتباط واریانت‌های مختلفی از ژن گیرنده اینترلوکین ۷ (IL7R) با

[2] SPMS (Secondary Progressive Multiple Sclerosis)

[3] PRMS (Progressive Relapsing Multiple Sclerosis)

بیماری مالتیپل اسکلروزیس پرداخته‌اند. در سال ۲۰۰۷ اولین مطالعه ارتباط در سطح کل ژنوم GWAS صورت گرفت و اولین ناحیه غیر HLA که شامل ژن‌های گیرنده آلفا اینترلوکین ۷ و گیرنده آلفای اینترلوکین ۲ بود با $P < 10^{-8}$ شناسایی شد که بیشترین ارتباط را با بیماری مالتیپل اسکلروزیس نشان می‌دادند(۲۲، ۲۳).

ژن FOXP1 (Forkhead Box P1) یک عضو از خانواده بزرگ فاکتورهای رونویسی FOX را کدگذاری می‌کند که با اعمال تنظیم بیان ژن با واسطه Foxp3 و امکان سیگنال دهی مؤثر IL-2 در سلول‌های T تنظیم کننده Regulatory T cells (Treg cells)، عملکرد ضروری در این سلول‌ها را ایفا می‌کند(۲۴). این فاکتور رونویسی همچنین برای تمایز، مهاجرت و تنظیم هموستاز Treg ها و عملکرد سرکوبگری آن‌ها ضروری و مهم می‌باشد(۲۵). پلی‌مورفیسم‌های این ژن در مطالعات GWAS کنسرسیوم بین‌المللی ژنتیک مالتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار گرفته و به‌عنوان یک ژن کاندید برای بیماری MS معرفی شده است(۲۶).

با توجه به شیوع بالای بیماری مالتیپل اسکلروزیس در ایران و نبود اطلاعات دقیق از زمینه ژنتیکی و واریانت‌های ژنتیکی مرتبط با این بیماری در بین جمعیت ایرانی نیاز بسیار به بررسی‌های ژنتیکی در این زمینه هست تا با شناسایی واریانت‌های مرتبط شایع این بیماری در جمعیت کشورمان گامی مفید در جهت پیشگیری و درمان این بیماری برداریم. لذا در مطالعه حاضر به آنالیز ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs6881706, rs9828629 و rs9967792 با بیماری RRMS در جمعیت شمال غرب ایران پرداختیم.

مواد و روش کار

جامعه مورد مطالعه:

درمجموع ۱۲۹ بیمار RRMS و ۲۰۰ شاهد سالم از جمعیت شمال غرب ایران که از نظر سن، جنس و نژاد مطابقت داشتند در یک مطالعه مورد شاهدی مقایسه شدند. بررسی‌های بالینی توسط متخصص مغز و اعصاب صورت گرفت و بیمارانی که با توجه به معیارهای مک دونالد از نظر بالینی نوع عودکننده _فروکش‌کننده بیماری مولتیپل اسکلروزیس را داشتند در مطالعه وارد شدند. گروه کنترل از افراد سالم و بدون سابقه بیماری عصبی انتخاب شدند. اطلاعات دموگرافیک نمونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. زنان ۸۲ نفر از بیماران RRMS را با نسبت زن به مرد ۱/۷۴ تشکیل می‌دهند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با کد اخلاقی IR.UMSU.REC.1397.131 تأیید و رضایتنامه کتبی آگاهانه از کلیه بیماران و گروه کنترل شرکت کننده در مطالعه گرفته شد. حداقل حجم نمونه مورد قبول برای این مطالعه از طریق فرمول زیر (27)محاسبه شد:

$$N= (Z_{1-\alpha/2})^2 p (1-p) /d^2$$

در این فرمول N حجم نمونه، $Z_{1-\alpha/2}$سطح اطمینان محقق (که برای سطح اطمینان ۹۵درصد، برابر با ۱/۹۶ در نظر گرفته می‌شود) P نسبت صفت در جامعه (که در صورت نامعلوم بودن ۰/۵ در نظر گرفته می‌شود) و d خطای قابل قبول برای محقق که در اینجا ۰/۱ در نظر گرفته شده است. بر اساس این فرمول ۹۶ نفر در هر گروه برای انجام مطالعه کافی می‌باشد در حالیکه در این مطالعه تعداد افراد بیشتری مورد بررسی قرار گرفته است.

جدول ۱. اطلاعات دموگرافیک بیماران مبتلا به RRMS و افراد کنترل شرکت کننده در مطالعه مورد – شاهد

	کنترل	بیمار
(%) تعداد زن	۱۳۴(۶۷%)	۸۲(۶۳/۵۶%)
(%) تعداد مرد	۶۶ (۳۳%)	۴۷(۳۶/۴۴%)
تعداد کل	۲۰۰	۱۲۹
نسبت زن به مرد	۲/۰۳	۱/۷۴
(انحراف معیار (بازه ± میانگین سنی در زمان نمونه‌گیری	۳۷/۵۴±۸/۵۵(۲۰-۶۰)	۳۷/۲۴±۷/۹۵(۲۲-۵۷)

استخراج DNA و انتخاب پلی‌مورفیسم‌ها و ژنوتایپینگ:

نمونهDNA از خون محیطی با استفاده از روش Salting out استخراج شد. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه بیوفوتومتر اپندورف سنجیده شد. سه پلی‌مورفیسم از ژن‌های کاندید rs9828628(FOXP1 gene),rs6881706(IL7R gene) rs9967792(STAT4 gene) که شواهدی از ارتباط با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت‌های اروپایی و غیره در مطالعات GWAS گذشته داشتند انتخاب شدند.

ژنوتایپ نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش PCR-ARMS تعیین شد. پرایمرهای هرکدام از پلی‌مورفیسم‌ها توسط برنامه آنلاین (WASP)، bioinfo.biotec.or.th/WASP/ طراحی و با برنامه آنلاین پرایمر بلاست بررسی شد (جدول ۲). جهت کنترل کیفیت، ۱۵درصد از نمونه‌ها به صورت تصادفی دوباره تعیین ژنوتایپ شدند و هیچ تناقضی مشاهده نشد.

جدول ۲. اطلاعات مربوط به توالی پرایمرها و دمای اتصال پرایمر و طول قطعه حاصل از ARMS-PCR

پلی‌مورفیسم (ژن)	پرایمرها	دمای اتصال پرایمر	طول قطعه باز
rs9828629 (FOXP1)	پرایمر رفت طبیعی GCATTAGAAAAGAGTTAGCACATG پرایمر رفت جهش یافتهGCATTAGAAAAGAGTTAGCACATA پرایمر برگشت مشترک ACATCCTAGAGAAATGAGGGCA	۵۶°C	۱۳۱
rs6881706 (IL7R)	پرایمر رفت مشترک TGGAATTTAGTGTCTGAGCC پرایمر برگشت طبیعی TCTGAAAGGAGATTGGAC پرایمر برگشت جهش یافته TCTGAAAGGAGATTGGAA	۵۰/۶۴ °C	۱۵۶
rs9967792 (STAT4)	پرایمر رفت طبیعی GAAAACATTCTAAGTACCACTGGAA پرایمر رفت جهش یافته GAAAACATTCTAAGTACCACTGGAG پرایمر برگشت مشترک CACCAGTTCACACACGGGA	۵۷/۶۳ °C	۲۲۰

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۲/۵میکرولیتر amaR OnePCR Master Mix و ۰/۵میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها و ۱/۵میکرولیتر DNA نمونه وتا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر ddH2O اضافه گردید. برنامه PCR به صورت یک مرحله دناتوراسیون اولیه، دردمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۲ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر (جدول۲) برای مدت ۴۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۵ دقیقه به منظور طویل سازی نهایی انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها:

فرکانس جزئی آلل MAF برای تأیید پلی‌مورفیسم در آن منطقه ژنتیکی باید بیشتر از ۰،۰۱ باشد لذا طبق پروژه ۱۰۰۰ ژنوم، فرکانس جزئی آلل هرکدام از پلی‌مورفیسم‌ها مشخص و در جدول ذکر شد. همچنین فرکانس اللی هرکدام از اللها در جمعیت مورد بررسی محاسبه و ذکر گردید (جدول۳).

سپس با استفاده از آزمون مربع کای با درجه آزادی d-1 و میزان خطای تیپ یک به بررسی وجود یا عدم وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های موردنظر و بیماری RRMS پرداختیم که آیا اختلاف معنی‌داری بین دو گروه بیمار و کنترل وجود دارد یا نه (فرضیه H0و H1). سپس تعادل هاردی-وینبرگ در افراد سالم با استفاده از آزمون دقیق فیشر برای بررسی مدل ارتباط مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی اثرات پلی‌مورفیسم بر حساسیت به RRMS، نسبت شانس ((ORو فاصله اطمینان ۹۵٪ (95%CI) با استفاده از نرم افزار آماری IBM SPSS 23 محاسبه شد. سطح معنی‌داری آماری (P <۰ / ۰۵) تعیین گردید. اهمیت آماری به‌عنوان p <۰/۰۱۶۹ به منظور حل مسائل چند آزمون و استفاده از تصحیح

Bonferroni تعریف شد. همچنین ما جنسیت (زن و مرد به‌عنوان زیر گروه) را به‌عنوان اصلاح اثر[1] در پلی‌مورفیسم مرتبط با RRMS بررسی کردیم.

یافته‌ها

بررسی توزیع ژنوتیپی rs9828629 و rs6881706 و rs9967792 از طریق آزمون دقیق فیشر بین دو گروه بیمار و کنترل صورت گرفت و نتایج به ترتیب P = ۰/۰۰۶ و P= ۰/۰۱۴ و P=۰/۰۲۱ می‌باشد لذا فرضیه H0 رد می‌شود و بر اساس فرضیه H1 از نظر آماری بین توزیع ژنوتیپی rs9828629 و rs6881706 و rs9967792 در دو گروه بیمار و کنترل اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

در بررسی تعادل هاردی واینبرگ در گروه کنترل برای هر سه پلی‌مورفیسم، گروه کنترل در تعادل هاردی واینبرگ بودند (جدول۳). لذا ارتباط هر سه پلی‌مورفیسم با بیماری RRMS با استفاده از مدل‌های مغلوب و غالب Recessive و Dominant بررسی شدند(۲۸).

جدول (۳): فرکانس جزئی الل طبق پروژه ۱۰۰۰ ژنوم،فرکانس اللی در گروه بیمار و گروه کنترل ،تعادل هاردی واینبرگ وP-Value

پلی‌مورفیسم (ژن)	کروموزوم: موقعیت	عملکرد پلی‌مورفیسم	فرکانس الل مینور در ۱۰۰۰ ژنوم	فرکانس اللی در گروه بیمار	فرکانس اللی در گروه کنترل	تعادل هاردی واینبرگ گروه کنترل	P-Value
rs9828629 (FOXP1)	۳ :۷۱۴۸۱۱۹۵	واریانت اینترونی	T: ۰/۲۸۵	T: ۰/۲۸۲ C: ۰/۷۱۷	T: ۰/۲۹ C: ۰/۷۱	۰/۳۶۴	۰/۰۰۶
rs6881706 (IL7R)	۵ :۳۵۸۷۹۰۵۴	واریانت ۳ پرایم UTR	T: ۰/۲۲۹	T: ۰/۳۲۱ G: ۰/۶۷۸	T: ۰/۲۳ G: ۰/۷۷	۰/۰۹۵	۰/۰۱۴
rs9967792 (STAT4)	۲ :۱۹۱۱۰۹۷۰۹	واریانت اینترونی	T: ۰/۲۹۴	T: ۰/۷۳۶ C: ۰/۲۶۳	T: ۰/۷۱۵ C: ۰/۲۸۵	۰/۲۴۷	۰/۰۲۱

در این مطالعه (rs9828629) ژنوتیپ CC و (rs6881706) ژنوتیپ GG و (rs9967792) ژنوتیپ CC ژنوتیپهای وحشی هستند بنابراین این ژنوتیپها به‌عنوان ژنوتیپهای رفرنس در نظر گرفته شدند. آنالیز ارتباط پلی مورفسم های موردنظر با بیماری RRMS طبق مدل مغلوب نشان داد که rs6881706 با بیماری RRMS ارتباط معنی‌دار دارد اما rs9967792 وrs9828629 هیچ‌گونه ارتباط معنی‌دار با بیماری RRMS ندارند. همچنین آنالیز ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs9828629 و rs6881706 و rs9967792 طبق مدل غالب هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری با بیماری RRMS نشان ندادند (جدول۴).

جدول (۴): آنالیز رگرسیون ژنوتیپی با استفاده از مدل مغلوب Recessive وغالب Dominant

پلی‌مورفیسم (ژن)	ژنوتایپ	بیمار	کنترل	مدل Recessive	مدل Dominant
rs9828629 (FOXP1)	TT	24	23	TT vs CT+CC	TT+CT vs CC
	CT	25	70		

[1] Modification effect

پلی‌مورفیسم (ژن)	ژنوتایپ	بیمار	کنترل	مدل Recessive	مدل Dominant
	CC	80	107	OR= 1.759	OR= 0.705
				95%CI= 0.946- 3.272	95%CI= 0.449- 1.107
				P-Value=0.072	P-Value=0.128
				TT vs GT+GG	
				OR= 2.522	TT+GT vs GG
	TT	27	19		OR= 1.335
rs6881706	GT	29	54	95%CI= 1.336- 4.759	
(IL7R)	GG	73	127		95%CI= 0.849- 2.097
				P-Value=0.004	
					P-Value=0.21
				TT vs CT+CC	TT+CT vs CC
	TT			OR= 1.496	
		21	23		OR= 0.687
rs9967792	CT	26	68	95%CI= 0.79- 2.833	
(STAT4)	CC	82	109		95%CI= 0.436- 1.081
				P-Value=0.214	
					P-Value=0.104

آنالیز رگرسیون اللی برای بررسی ارتباط بین الل مینور و بیماری RRMS با استفاده از مدل Multiplicative صورت گرفت. rs9967792 الل T و rs9828629 الل T هیچ‌گونه ارتباط و همبستگی با RRMS نشان ندادند. rs6881706 الل T ارتباط معنی‌داری با RRMS (P= ۰/۰۰۹ و OR= ۱/۵۸۸ – ۲/۲۵۳ CI=۱ /۱۱۹ ٪۹۵) نشان داد (جدول۵).

جدول (۵): آنالیز رگرسیون اللی با استفاده از مدل Multiplicative

پلی‌مورفیسم (ژن)	OR (%۹۵ CI)	P-Value
rs9828629 (FOXP1)	T vs C ۰/۹۶۶(۰/۶۸۳ – ۱/۳۶۶)	۰/۸۴۵
rs6881706 (IL7R)	T vs G ۱/۵۸۸(۱/۱۱۹ – ۲/۲۵۳)	۰/۰۰۹
rs9967792 (STAT4)	T vs C ۰/۸۹۸ (۰/۶۳۲ – ۱/۲۷۷)	۰/۵۴۸

اصلاح اثر:

در این مطالعه ارتباط rs6881706 با RRMS در دو زیرگروه زن و مرد بررسی شد و هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین OR کل و OR زیرگروه‌ها (x^2= ۳) با درجه آزادی ۱ مشاهده نشد. بنابراین جنسیت به‌عنوان اصلاح اثر در این مطالعه در نظر گرفته نمی‌شوند.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های rs9828629, rs6881706, rs9967792 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس عودکننده _فروکش‌کننده بین گروه بیمار و کنترل در جمعیت شمال غرب ایران بررسی شدند. تفاوت معنی‌داری بین فرکانس ژنوتیپی (P= ۰/۰۰۶)rs9828629و (P= ۰/۰۱۴)rs6881706و (P= ۰/۰۲۱)rs9967792در گروه بیمار و کنترل مشاهده شد. سپس طی آنالیز ارتباط بر اساس مدل مغلوبRecessive هیچ ارتباطی بینrs9828629 و rs9967792 با بیماری RRMS مشاهده نشد. rs6881706 تحت آنالیز مدل مغلوب (TT vs GT+GG)(P= ۰/۰۰۴ و OR= ۲/۵۲۲و ۴/۷۵۹ - ۱/۳۳۶ = CI ۹۵ ٪) با بیماری RRMS ارتباط قوی نشان داد. هم چنین در بررسی اللی پلی‌مورفیسم‌های rs9967792 و rs9828629 هیچ ارتباطی با بیماری RRMS نشان ندادند در حالیکه rs6881706 (T vs G) تحت مدل Multiplicative با۰/۰۰۹=Pو۱/۵۸۸ =ORو۲/۲۵۳ - ۱ /۱۱۹ =۹۵٪CI در ارتباط قوی با بیماری RRMS می‌باشد. این ارتباط بعد از اعمال تصحیح (۰/۰۱۶۹ = p) Bonferroni تغییری نکرده و همچنان ارتباط قوی با بیماری RRMS نشان داد.

rs6881706 یک واریانت در ناحیه 3`UTR ژن IL7R می‌باشد. ژن IL7R یک پروتیین ۲۵ کیلودالتونی (گیرنده اینترلوکین ۷) را کد می‌کند که برای تکامل سلول‌های T ضروری می‌باشد(۲۹). عملکرد این گیرنده به گیرنده اینترلوکین ۲، زنجیره گاما نیاز دارد، که یک زنجیره گامای مشترک است و توسط گیرنده‌های مختلف سیتوکین ها از جمله اینترلوکین های ۲، ۴، ۷، ۹ و ۱۵ مشترک است. این پروتئین نقش مهمی در ترکیب مجدد V (D) J در طی تکامل لنفوسیت‌ها دارد. در سال ۲۰۱۳ یک مطالعه GWAS توسط کنسرسیوم بین‌المللی ژنتیک مالتیپل اسکلروزیس صورت گرفت و rs6881706 به‌عنوان یکی از پلی‌مورفیسم‌های مرتبط با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت اروپایی گزارش گردید. در مطالعه‌ای که در سال۲۰۱۴ در شرق ایران روی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس صورت گرفت ۴ پلی‌مورفیسم در ژن گیرنده آلفای اینترلوکین ۷ بررسی شد و یک ارتباط قوی بین rs7718919 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس مشخص گردید(۳۰).

بر طبق نتایج حاصله می‌توان از rs6881706 به‌عنوان یک بیومارکرژنتیکی در تشخیص و غربالگری بیماری مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت شمال غرب ایران بهره جست. البته جهت تأیید این نتیجه و حتی تعمیم آن به دیگر جمعیت‌های ایرانی مطالعاتی با حضور جمعیت‌های اقوام دیگر در مقیاسی بزرگتر مورد نیاز است. این مطالعه در یک جمعیت کوچک با تعداد نمونه نسبتاً محدود انجام گرفته است لذا تکرار این مطالعه با جمعیت‌های بزرگتر و در مناطق جغرافیایی متفاوت خالی از لطف نیست.

تشکر و قدردانی

از تمامی شرکت کنندگان در گروه‌های کنترل و بیمار و انجمن MS استان آذربایجان غربی به سبب یاری رسانی در انجام مطالعه مذکور تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

1. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. Nat Rev Genet 2008;9(7): 516-26.
2. Mohamadirizi S, Shaygannejad V, Mohamadirizi S, Mohamadirizi M. Eating Disorders in a Multiple Sclerosis Clinical Population and its Association with Social Anxiety. J Mult Scler 2016;3(183): 2376-0389.1000183.
3. Rima R. A Rare Case of Familial Multiple Sclerosis. J Neurol Disord 2015: 1-2.
4. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.Ann Neurol 2001;50(1): 121-7.
5. Inglese M. Multiple sclerosis: new insights and trends. AJNR Am J Neuroradiol 2006;27(5): 954-7.
6. Crayton H, Heyman RA, Rossman HS. A multimodal approach to managing the symptoms of multiple sclerosis. Neurology 2004;63(11 suppl 5): S12-8.
7. Mahmoud AB, Hfaiedh S, Derbali H, Ali NB, Fraj M, Blel S. Can we speak about a psychiatric attack during multiple sclerosis? Eur J Neurol 2012;19: 370.
8. Gooshe M, Abdolghaffari AH, Gambuzza ME, Rezaei N. The role of Toll-like receptors in multiple sclerosis and possible targeting for therapeutic purposes. Rev Neurosci 2014;25(5): 713-39.
9. Hawkes C, Macgregor A. Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. Mult Scler 2009;15(6): 661-7.
10. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. BMC Neurol 2013;13(1): 128.
11. Evans C, Beland S-G, Kulaga S, Wolfson C, Kingwell E, Marriott J, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. Neuroepidemiology 2013;40(3): 195-210.
12. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. Acta Neurol Scand 1975;51(2): 110-36.
13. Kurtzke JF. Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview. Neurology 1980;30(7 Pt 2): 61-79.
14. Sahraian MA, Khorramnia S, Ebrahim MM, Moinfar Z, Lotfi J, Pakdaman H. Multiple sclerosis in Iran: a demographic study of 8,000 patients and changes over time. Eur Neurol 2010;64(6): 331-6.
15. Etemadifar M, Izadi S, Nikseresht A, Sharifian M, Sahraian MA, Nasr Z. Estimated prevalence and incidence of multiple sclerosis in Iran. Eur Neurol 2014;72(5-6): 370-4.
16. Heydarpour P, Mohammad K, Yekaninejad MS, Elhami SR, Khoshkish S, Sahraian MA. Multiple sclerosis in Tehran, Iran: a joinpoint trend analysis. Mult Scler 2014;20(4): 512.
17. Ahlgren C, Oden A, Lycke J. A nationwide survey of the prevalence of multiple sclerosis in immigrant populations of Sweden. Mult Scler 2012;18(8): 1099-107.
18. Nasr Z, Majed M, Rostami A, Sahraian MA, Minagar A, Amini A, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Iranian emigrants: review of the evidence. Neurol Sci 2016;37(11): 1759-63.
19. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. Science 1996;273(5281): 1516-7.
20. Mathur AN, Chang H-C, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. J Immunol 2007;178(8): 4901-7.
21. Kroemer RT, Richards WG. Homology modeling study of the human interleukin-7 receptor complex. Protein Eng Des Sel 1996;9(12): 1135-42.
22. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, et al. Interleukin 7 receptor alpha chain

(IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. Nat Genet 2007;39(9): 1083-91.

23. Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallstrom E, Khademi M, et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. Nat Genet 2007;39(9): 1108-13.
24. Konopacki C, Pritykin Y, Rubtsov Y, Leslie CS, Rudensky AY. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function. Nat Immunol 2019;20(2): 232-42.
25. Ren J, Han L, Tang J, Liu Y, Deng X, Liu Q, et al. Foxp1 is critical for the maintenance of regulatory T-cell homeostasis and suppressive function. PLoS Biol 2019;17(5): e3000270.
26. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kemppinen A, Cotsapas C, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet 2013;45(11): 1353-60.
27. Beikzadeh B, Angaji SA, Abolhasani M. Association study between common variations in some candidate genes and prostate adenocarcinoma predisposition through multi-stage approach in Iranian population. BMC Med Genet 2020;21(1): 81.
28. Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. Brief Bioinformatics 2002;3(2): 146-53.
29. Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, et al. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. Cell 1990;60(6): 941-51.
30. Haj MS, Nikravesh A, Kakhki MP, Rakhshi N. Association study of four polymorphisms in the interleukin-7 receptor alpha gene with multiple sclerosis in Eastern Iran. Iran. J Basic Med Sci 2015;18(6): 593.

Original Article

ASSOCIATION STUDY OF STAT4, IL7R, AND FOXP1 GENE POLYMORPHISMS WITH MULTIPLE SCLEROSIS IN THE NORTHWEST OF IRAN

*Elinaz Akbariazar[1], Seyed Abdolhamid Angaji [*2], Parviz Pakzad[3], Isa Abdi Rad[4], Arash Mosarrezaii[5]*

Received: 05 March, 2021; Accepted: 03 December, 2021

Abstract:

Background & Aims: Multiple sclerosis (MS) (MIM # 126200) is a chronic inflammatory demyelinating disorder of the central nervous system (CNS) that is recognized as the most common cause of non-traumatic neurological disability in young adults. The aim of this study was to evaluate the association between rs9828628 (FOXP1 gene), rs6881706 (IL7R gene), rs9967792 (STAT4 gene) with relapsing-remitting MS (RRMS).

***Materials & Methods*:** The case-control study included 129 cases with RRMS and 200 healthy individuals. ARMS-PCR technique was performed for genotyping rs9828628, rs6881706, rs9967792. Chi-square, Fisher's exact test, and allelic and genotypic regression analysis were used to investigate the association of these polymorphisms with RRMS.

***Results*:** Considering the total population studied a significant association was observed between rs6881706 and RRMS with OR = 2.522 and 95% CI = 1.336 – 4.759 and p-value = 0.004. The association of this polymorphism with RRMS did not change after using Bonferroni correction (p =0.0169). No association was observed between rs9828628 and rs9967792 with RRMS**.**

***Conclusion*:** The current study replicated three polymorphisms of GWAS susceptibility SNPs in the Northwest of Iran. There was a significant association between rs6881706 and RRMS, while no association was observed between rs9967792, rs9828629, and RRMS.

The importance of validated polymorphisms is essential to understand the signaling pathways in RRMS and to use them as a genetic biomarker in diagnosing and screening the disease and establishing a new drug target.

***Keywords*:** Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS), Polymorphism¸ STAT4, IL7R, FOXP1

Address: Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
Tel: +989123058891
Email: angaji@khu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(4): 289 ISSN: 2717-008X

[1] Ph.D. Candidate, Department of Genetics, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of biological sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran (Corresponding Author)
[3] Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4] Professor, Department of Genetics, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Neurology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran