

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

الیناز اکبری آذر^۱، سیدعبدالحمید انگجی^{۲*}، پروین پاکزاد^۳، عیسی عبدی‌راد^۴، آرش موسی‌رضایی^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 شاهدهی 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 الی 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 $95\%CI = ۱/۳۳۶ - ۴/۷۵۹$ و $P_Value = ۰/۰۰۴$ مشاهده شد. پس از استفاده از تصحیح (Bonferroni) $(P = ۱/۰۱۶۹)$ 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 rs9828629 و rs9967792 با بیماری RRMS ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. اهمیت پلی‌مورفیسم‌های تأییدشده برای درک مسیرهای سیگنالینگ در بیماری RRMS و استفاده از آن‌ها به‌عنوان یک بیومارکر ژنتیکی 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 مفتاح، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی، تلفن: ۰۲۱۹۶۶۶۴۵۵۰

Email: angaji@khu.ac.ir

مقدمه

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^۱ ۲. پیش‌رونده اولیه

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

^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

^۱ Relapsing-Remitting

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 انجام گرفته در سوئد و نروژ و انگلیس و هند صورت گرفته مشخص شده که شیوع مالتیپل اسکلروزیس در مهاجران ایرانی کشورهای ذکر شده در مقایسه با مردم بومی بیشتر می باشد (۱۸).

در مطالعاتی که در زمینه مطالعه ارتباط ژن کاندید در بیماری مالتیپل اسکلروزیس صورت گرفته فرکانس الی و ژنوتیپی مارکرها مخصوصاً پلی مورفیسمها بین بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس غیر خویشاوند و افراد کنترل سالم باهدف شناسایی تفاوت های مهم و مشخص بین دو گروه ذکر شده جهت ارتباط دادن با بیماری مقایسه شده اند و اعتقاد بر این است که مطالعات ژن کاندید با پلی مورفیسمها توانایی بیشتری در تشخیص ال های شایع با یک اثر میانه بر روی احتمال بیماری نسبت به مطالعات پیوستگی دارند به شرطی که ژن های کاندید مناسبی برای بررسی انتخاب شوند (۱۹) ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن های FOXP1 و IL7R و STAT4 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در مطالعات گذشته بررسی شده و بعضی از مطالعات ارتباط قوی با MS را نشان داده اند و برخی دیگر هیچ ارتباطی نشان نداده اند. ژن STAT4 یک فاکتور رونویسی را رمزگذاری می کند که می تواند 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 مانند IL-12 و IL-23 و IL-15 و افزایش تولید اینترفرون گاما ضروری می باشد لذا در پلاریزاسیون و تداوم پاسخ ایمنی سلولی Th1 نقش مهمی ایفا می کند. همچنین فاکتور رونویسی کد شده توسط ژن STAT4 در تکامل سلول های Th17 که نقش اساسی در التهاب مرتبط با خودایمنی دارند مؤثر می باشد (۲۰). از طرفی درگیری گسترده اینترفرون های 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 سلول های ایمنی است که از دو زیر واحد، گیرنده اینترلوکین ۷ آلفا (CD127) و گیرنده های زنجیره مشترک گاما (CD132) تشکیل شده است. گیرنده های زنجیره 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

۳. پیش رونده ثانویه ۴.۲. عودکننده پیش رونده ۳ (۴) در بین این چند نوع مالتیپل اسکلروزیس الگوی عودکننده فروکش کننده و پیش رونده ثانویه شایع ترین می باشد (۵) پزشکان به غیر از این چهار نوع مالتیپل اسکلروزیس، نوع خفیفی از این بیماری را شناسایی کرده اند به نام حسی خوش خیم که افراد مبتلا به این نوع از بیماری دچار حملاتی می شوند که فقط باعث از دست رفتن بینایی و یا حس های دیگر می شود و این علائم معمولاً موقتی بوده و به ندرت باعث بروز ناتوانی های دائمی می شود (۶).

بیماری مالتیپل اسکلروزیس یکی از شایع ترین علل ناتوانی نورولوژیکی غیر ترومایی در بین جوانان می باشد و بیشتر در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی تشخیص داده می شود ولی تظاهرات اولیه می تواند 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 می دهند که نسبت زنان مبتلا به مردان مبتلا بیشتر بوده و حدود ۲ به ۱ می باشد (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 درجه یک بیمار مبتلا ۱ الی ۳ درصد احتمال ایجاد بیماری وجود دارد. مطالعات دوقلوها میزان هماهنگی بالایی در حدود ۲۵-۳۰ درصد در دوقلوهای مونوزایگوت و ۵ درصد در دوقلوهای دی زایگوت را نشان می دهد و این ثابت می کند که ژنتیک یک عامل قوی در این بیماری می باشد (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 به عنوان یک ناحیه با شیوع بالای این بیماری شناخته شده است برخلاف فرضیه ۱۵ سال پیش که ایران را به عنوان منطقه ای با شیوع کمتر از ۵ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر معرفی می کرد (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 استان های مختلف کشور می باشد (۱۵). از طرفی ایران بیشترین شیوع این بیماری را در خاورمیانه و آسیا دارد (۱۶). ایران در ۴ دهه گذشته شاهد افزایش قابل توجهی در مهاجرت بوده است و در نتیجه در مطالعات مختلفی که در کشورهای مختلف دنیا در زمینه شیوع

³ PRMS (Progressive Relapsing Multiple Sclerosis)

² SPMS (Secondary Progressive Multiple Sclerosis)

مواد و روش کار

جامعه مورد مطالعه:

در مجموع 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 شاهدهی مقایسه شدند. بررسی‌های بالینی توسط متخصص مغز و اعصاب صورت گرفت و بیمارانی که با توجه به معیارهای مکرر دونالد از نظر بالینی نوع عودکننده - فروکش‌کننده بیماری مالتیپل 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 شرکت‌کننده 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 ۹۵ درصد، 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.

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 تنظیم‌کننده (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). پلی مورفیسم‌های این ژن در مطالعات GWAS کنسرسيوم 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 پلی مورفیسم‌های rs9967792 و rs9828629, rs6881706 و rs9967792 با بیماری RRMS در جمعیت شمال غرب ایران پرداختیم.

جدول ۱. اطلاعات دموگرافیک بیماران مبتلا به RRMS و افراد کنترل شرکت‌کننده در مطالعه مورد - شاهد

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

استخراج DNA و انتخاب پلی مورفیسیمها و ژنوتایپینگ:

نمونه DNA از خون محیطی با استفاده از روش Salting out استخراج شد. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه بیوفوتومتر اپندورف سنجیده شد. سه پلی مورفیسیم از ژنهای rs9828628(FOXP1 gene), rs6881706(IL7R) و 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 هر کدام از پلی مورفیسیمها توسط برنامه آنالین (WASP)، (WASP/ bioinfo.biotech.or.th طراحی و با برنامه آنالین پرایمر بلاست بررسی شد (جدول ۲). جهت کنترل کیفیت، ۱۵ درصد 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

پلی مورفیسیم (ژن)	پرایمرها	دمای اتصال پرایمر	طول قطعه باز
rs9828629 (FOXP1)	پرایمر رفت طبیعی GCATTAGAAAAGAGTTAGCACATG پرایمر رفت جهش یافته GCATTAGAAAAGAGTTAGCACATA 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 ۱۲/۵ میکرولیتر amaR OnePCR Master Mix و ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها و ۱/۵ میکرولیتر DNA نمونه و تا 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 (جدول ۲) برای مدت ۴۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۵ 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 پلی مورفیسیم در آن منطقه ژنتیکی باید بیشتر از ۰،۱ باشد لذا طبق پروژ ۱۰۰۰ ژنوم، فرکانس

جزئی آلل هر کدام از پلی مورفیسیمها مشخص و در جدول ذکر شد. همچنین فرکانس آللی هر کدام از الیها در جمعیت مورد بررسی محاسبه و ذکر گردید (جدول ۳).

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 پلی مورفیسیمهای مورد نظر و بیماری RRMS پرداختیم که آیا اختلاف معنی داری بین دو گروه بیمار و کنترل وجود دارد یا نه (فرضیه H0 و 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 پلی مورفیسیم بر حساسیت به RRMS، نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ (95%CI) با استفاده از نرم افزار آماری IBM SPSS 23 محاسبه شد. سطح معنی داری آماری (P < ۰/۰۵) تعیین گردید. اهمیت آماری به عنوان p < ۰/۰۱۶۹ به منظور حل مسائل چند آزمون و استفاده از تصحیح

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 پلی مورفیسم، گروه کنترل در تعادل هاردی واینبرگ بودند (جدول ۳). لذا ارتباط هر سه پلی مورفیسم با بیماری RRMS با استفاده از مدل‌های مغلوب و غالب Recessive و Dominant بررسی شدند (۲۸).

Bonferroni تعریف شد. همچنین ما جنسیت (زن و مرد به‌عنوان زیر گروه) را به‌عنوان اصلاح اثر^۱ در پلی مورفیسم 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 $P = 0.006$ و $P = 0.014$ و $P = 0.021$ می‌باشد لذا فرضیه H_0 رد می‌شود و بر اساس فرضیه

جدول (۳): فرکانس جزئی الی طبق پروژ ۱۰۰۰ ژنوم فرکانس الی در گروه بیمار و گروه کنترل، تعادل هاردی واینبرگ و P-Value

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

RRMS ارتباط معنی‌دار دارد اما rs9967792 و rs9828629 هیچ‌گونه ارتباط معنی‌دار با بیماری RRMS ندارند. همچنین آنالیز ارتباط پلی مورفیسم‌های rs6881706 و rs9828629 و rs9967792 طبق مدل غالب هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری با بیماری RRMS نشان ندادند (جدول ۴).

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 مورفیسم‌های موردنظر با بیماری RRMS طبق مدل مغلوب نشان داد که rs6881706 با بیماری

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

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

¹ Modification effect

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

همبستگی با RRMS نشان ندادند. rs6881706 ال T ارتباط
معنی داری با RRMS (P= ۰/۰۰۹ و OR= ۱/۵۸۸ و ۲/۲۵۳ -
۱/۱۱۹ CI=۰/۹۵) نشان داد (جدول ۵).

آنالیز رگرسیون الی برای بررسی ارتباط بین ال مینور و
بیماری RRMS با استفاده از مدل Multiplicative صورت گرفت.
rs9967792 ال T و rs9828629 ال T هیچ گونه ارتباط و

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

پلی مورفیسم (ژن)	OR (%۹۰ 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 ($x^2=3$) 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 پلی مورفیسم‌های 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 rs9828629 ($P=0.006$) و rs6881706 ($P=0.014$) و rs9967792 ($P=0.021$) در گروه بیمار و کنترل مشاهده شد. سپس طی آنالیز ارتباط بر اساس مدل مغلوب Recessive هیچ ارتباطی بین rs9828629 و rs9967792 با بیماری RRMS مشاهده نشد. تحت آنالیز مدل مغلوب (TT vs (GT+GG) $OR=2/522$ و $P=0.004$ و $CI=1/336 - 4/759$ با بیماری RRMS ارتباط قوی نشان داد. هم‌چنین در بررسی الی پلی مورفیسم‌های rs9967792 و rs9828629 هیچ ارتباطی با بیماری RRMS نشان ندادند در حالیکه rs6881706 (T vs G) تحت مدل Multiplicative با $P=0.009$ و $OR=2/253$ و $CI=1/119 - 4/95$ در ارتباط قوی با بیماری RRMS می‌باشد. این ارتباط بعد از اعمال تصحیح ($p = Bonferroni$) تغییر 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 سیتوکین‌ها از جمله اینترلوکین‌های ۲، ۴، ۷، ۹ و ۱۵ مشترک است. این پروتیین نقش مهمی در ترکیب مجدد J (D) V در طی تکامل لنفوسیت‌ها دارد. در سال ۲۰۱۳ یک مطالعه GWAS توسط کنسرسیون بین‌المللی ژنتیک مالتیپل اسکلروزیس صورت گرفت و rs6881706 به‌عنوان یکی از پلی مورفیسم‌های مرتبط با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در جمعیت اروپایی گزارش گردید. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ در شرق ایران روی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس صورت گرفت ۴ پلی مورفیسم 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 بیومارکر ژنتیکی 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 شرکت‌کنندگان 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, Nikseresh 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, Kempainen 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, Nikravesht 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.

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

*Elinaz Akbariazar¹, Seyed Abdolhamid Angaji^{*2}, Parviz Pakzad³, Isa Abdi Rad⁴, Arash Mosarrezai⁵*

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