



پاراکلینیکی (آزمایشگاهی و تصویربرداری)، موردبررسی قرار گرفتند. فقط بیماران مبتلا به نوع عودکننده- فروکش‌کننده مالتیپل اسکروزیس در مدت ۲ سال که هیچ تشدید در سه‌ماهه گذشته نداشتند، در مطالعه وارد شدند. نمونه‌گیری بیماران در انجمن MS خوزستان و با رضایت کامل بیماران برای انجام این مطالعه صورت پذیرفت (از بیماران رضایت‌نامه کتبی دریافت گردید). وضعیت ناتوانی آن‌ها با مقیاس وضعیت ناتوانی گسترده (EDSS) Kurtzke (اندازه‌گیری شد (۸). گروه کنترل شامل ۵۰ مرد سالم که از نظر سن و قومیت با گروه بیمار مطابقت داشته و همچنین بدون سابقه بیماری خودایمن بودند و با آگاهی کامل و پس از ارائه رضایت‌نامه کتبی در این مطالعه شرکت نمودند.

از کلیه بیماران و گروه کنترل حدود ۵ میلی‌لیتر خون گرفته و در لوله‌های فالتون حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ مولار اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) به‌عنوان ماده ضد انعقاد جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گیرد. ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ژن *tnfrsf6b* (rs6062314 T/C) با استفاده از PCR و روش توالی‌یابی سانجر مشخص شد. پرایمرهای انتخاب شده‌ی ما در این مطالعه دارای خصوصیات ذکرشده در جدول ۱ می‌باشند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵  $\mu$ l و با برنامه حرارتی و زمانی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، دناتوراسیون ثانویه در ۹۴°C که توسط ۳۵ سیکل دناتوراسیون به مدت یک دقیقه دنبال شد، دمای آنیلینگ (۶۰°C، یک دقیقه) و دمای گسترش (۷۲°C، ۴۵ ثانیه) انجام شد. واکنش، بعد از گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه به پایان رسید. ۵ میکرولیتر از محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد load شد و باندهای خاص توسط safe stain DNA (سیناژن، تهران، ایران) قابل مشاهده گردید. پس از استخراج DNA از نمونه‌های مختلف و تکثیر کردن توالی موردنظر به کمک PCR، نمونه‌ها به همراه پرایمر Reverse به‌منظور توالی‌یابی ارسال شدند.

ترانس‌ممبران در توالی خود بوده و یک پروتئین ترشحی است (۲). با تجزیه و تحلیل ترکیبی پرتو و از طریق اتصال به یک مارکر، نقشه ژن *tnfrsf6b* روی کروموزوم 20q13 معین شد. توالی DNA این ژن که روی کروموزوم ۲۰ قرار دارد، رونوشتی دارای ۷ اگزون و ۶ اینترون با طول ۳/۶ kb را شامل می‌شود. TNFRSF6B می‌تواند به اعضای خانواده LIGHT, FasL, TNF و TL1A متصل شود و در نتیجه تعامل TNFRSF6B با LIGHT, FasL و TL1A آپوپتوز ناشی از Fas,  $LT\beta R$ , و DR3 را مسدود می‌کند (۴-۲). پلی‌مورفیسم در نزدیکی ژن‌های کدکننده اعضای *tnfrsf6b*; *tnfrsf* و *tnfrsf14* اخیراً با دو بیماری مختلف خودایمنی، بیماری کرون و آرتریت روماتوئید همراهی نشان داده است، همچنین پلی‌مورفیسم مربوط به هر دو ژن *tnfrsf6b* و *tnfrsf14*، با خطر ابتلا به بیماری MS همراه بود (۶-۵).

در این تحقیق ارتباط بین پلی‌مورفیسم *rs6062314(tnfrsf6b)* و بیماری مالتیپل اسکروزیس در جمعیت مردان مبتلا به مالتیپل اسکروزیس تک‌گیر در استان خوزستان را موردبررسی قرار دادیم. ارتباط پلی‌مورفیسم *rs6062314(tnfrsf6b)* با بیماری MS، باعث تشخیص بیشتر پاتوژن‌های MS و محدود کردن افراد از عوامل افزایش‌دهنده خطر ابتلا به این بیماری می‌شود. در این مطالعه ما ژنوتیپ SNP *tnfrsf6b* (rs6062314 T/C) واقع در ناحیه اینترونی ژن *tnfrsf6b* در مردان بیمار مبتلا به ام‌اس و گروه کنترل در استان خوزستان را تعیین کردیم. همچنین احتمال همراهی هر ژنوتیپ و آلل را با استعداد ابتلا به ام‌اس موردبررسی قرار دادیم.

## مواد و روش کار

در این مطالعه از ۵۰ مرد مبتلا به مالتیپل اسکروزیس که توسط پزشک متخصص و بر اساس معیار تشخیص McDonald (۷) تأیید تشخیص گرفته، نمونه‌گیری انجام شد. تمامی بیماران در جمعیت مورد مطالعه، مبتلا به نوع RRMS بودند. تمام بیماران برای سوابق پزشکی فعلی و گذشته از قبیل تست‌های مغز و اعصاب و داده‌های

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای رفت و برگشت برای *tnfrsf6b*(rs6062314)

Name	Primer sequence	Tm
<i>tnfrsf6b</i> (rs6062314) F	5'- g a y t g t g c t g a t g g c t a c a g g a - 3'	57/6°C
<i>tnfrsf6b</i> (rs6062314) R	5'- t t c c a g g g t g t t g c a g a y g t c - 3'	60/4°C

## یافته‌ها

در این تحقیق جمعیت ۵۰ نفری از بیماران مرد مبتلا به MS در استان خوزستان که بیماری آن‌ها توسط متخصصین نورولوژی بر اساس معیار Revised McDonald تشخیص داده شد، مورد بررسی قرار گرفتند. همه بیماران مقیاس وضعیت ناتوانی گسترده (EDSS) کم‌تر از ۴ داشتند.

ما (rs6062314) SNP واقع در ژن *tnfrsf6b* را در ۵۰ مرد بیمار و ۵۰ کنترل همسان سالم تعیین ژنوتیپ کردیم. بر اساس نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR، باند مربوط به ژن

*tnfrsf6b* ۴۲۵ bp می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که SNP ژن *tnfrsf6b* در جمعیت ما پلی مورفیسم نیست. جدول‌های ۲ و ۳ فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم rs6062314 را در بیماران مبتلا به MS و کنترل‌های سالم نشان می‌دهد. تفاوت معنی‌دار آماری در توزیع آلل‌ها و ژنوتیپ‌های rs6062314 ژن *tnfrsf6b* بین بیماران و کنترل‌های سالم وجود ندارد ( $P_{TC}=0/268$ ) و ( $P_{CC}=1/0$ ) و برای آلل C  $OR=3/128$ ,  $95\% CI = (0/61 - 15/89)$ .

جدول (۲): توزیع فراوانی آللی پلی مورفیسم ژن *tnfrsf6b* و خطر همراهی با بیماری MS

P value	OR (% 95 CI)	PATIENT	Control	Allele
-	1 (Reference)	0/94	0/98	T
0/279	3/128 (0/61 – 15/89)	0/06	0/02	C

P-value < 0/05 .OR: odds ratio CI: confidence intervals

جدول (۳): توزیع فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم ژن *tnfrsf6b* و خطر همراهی با بیماری MS

Genotype	OR (% 95 CI)		P value
	Control N = 50 (%)	Patient N = 50 (%)	
TT	48 (96)	44 (88)	1 (Reference)
TC	2 (4)	6 (12)	3/27 (0/63 – 17/08)
CC	0 (0)	0 (0)	1/10 (0/02 – 56/15)

P-value < 0.05 .OR: odds ratio CI: confidence intervals

با توجه به نتایج حاصله که در جدول و نمودار آورده شده، هیچ ارتباط معنی‌داری بین بیماران وجود ندارد.

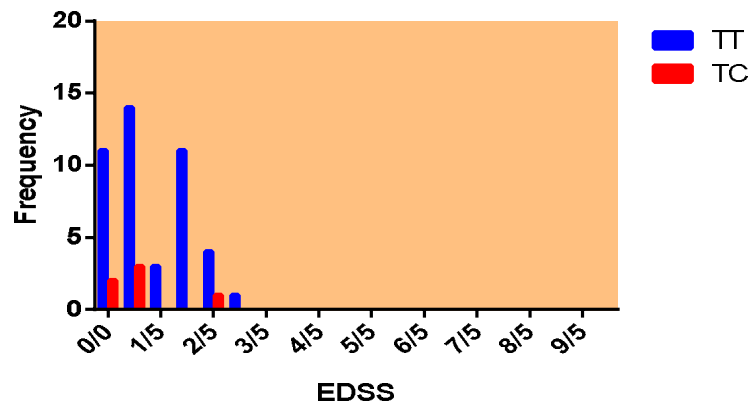
جدول (۴): فراوانی ژنوتیپی و OR پلی مورفیسم ژن *tnfrsf6b* در بیماران MS با درجه ناتوانی (EDSS) مختلف

Genotype	EDSS 0-1.5	EDSS 2-3	OR (% 95 CI)	P value
TT	28	16	1 (Reference)	
TC	5	1	0/35 (0/03 – 3/26)	0/65

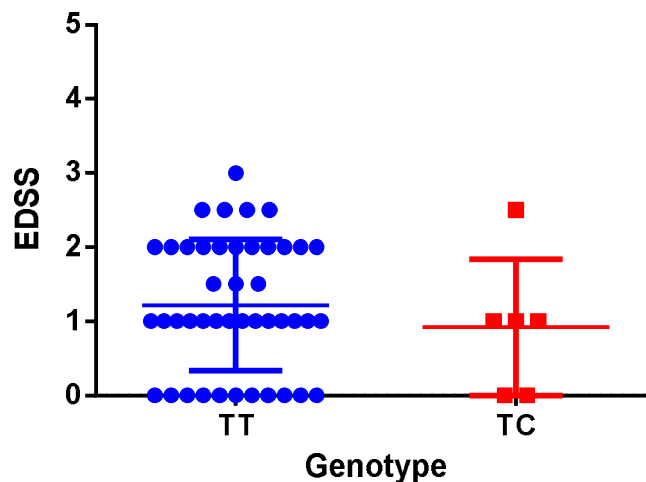
ژنوتیپ‌ها و EDSS نتایج حاصل از بررسی میانگین EDSS در ژنوتیپ‌های TT و TC، در جدول و نمودار آورده شده است.

جدول (۵): بررسی میانگین EDSS در ژنوتیپ‌های مشاهده شده

Genotype	MS N=50		P value
	Mean	Std. Error of Mean	
TT	1/216 ± 0/88	0/13	0/427
TC	0/917 ± 0/917	0/37	



نمودار (۱): توزیع فراوانی ژنوتیپی در بیماران MS با EDSS مختلف



نمودار (۲): میانگین EDSS در ژنوتیپ‌های مختلف بیماران MS

می‌تواند به شناسایی سبب‌زایی بیماری و در نتیجه به درمان آن بیماری کمک کند. مطالعات انجام گرفته در طول دهه گذشته نشان داده‌اند، تعداد ژن‌ها و لوکوس‌های شناسایی شده که مستعدکننده این بیماری و سایر بیماری‌های پیچیده می‌باشند، افزایش یافته‌اند. مطالعات همراهی گسترده ژنومی (GWAS)، عوامل ژنتیکی دیگری را شناسایی کرده‌اند؛ مثلاً در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ در اروپا بر روی ۱۴۴۹۸ بیمار مبتلا به MS و ۲۴۰۹۱ کنترل برای SNP۱۶۱۳۱۱ اتوزومال مورد بررسی قرار گرفت که ۱۳۵ منطقه مرتبط بالقوه و ۴۸ واریانت خطر جدید برای MS در بیرون از ناحیه HLA معین شد که پلی‌مورفیسم ژن *tnfrsf6b* (rs6062314) را نیز شامل می‌شود (۹). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ در اسپانیا بر

## بحث و نتیجه‌گیری

مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری خودایمن، التهابی، دمیلینه‌کننده سیستم اعصاب مرکزی انسان است و جزء بیماری‌های چند فاکتوری به شمار می‌رود زیرا ژن‌های بسیار زیادی در بروز این بیماری دخیل هستند. علاوه بر نقش ژن‌ها در بروز این بیماری میان‌کنش‌های بین‌ژنی و محیط نیز در بروز این بیماری تأثیرگذار هستند. بیماری‌های چندژنی چند فاکتوری مانند بیماری MS مکانیسم مولکولی ناشناخته‌ای دارند. اکثر ژن‌های درگیر در ایجاد استعداد به این بیماری، در دسته ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی می‌باشند؛ بنابراین مطالعه فراوانی آلل‌هایی که نقش احتمالی در ایجاد بیماری MS دارند، موضوع بسیاری از تحقیقات است که

بررسی پلی مورفیسم از روش PCR و توالی‌یابی سانجر استفاده کردیم.

از نظر درجه‌ی ناتوانی (EDSS) نیز بیشترین افراد در جمعیت ما درجه‌ی ناتوانی بین ۲-۰ داشتند و فراوانی بیماران با درجه‌ی ناتوانی ۳ بسیار کم بود.

همان‌طور که نتایج این بررسی نشان داد، فراوانی آلل‌های T و C ژن *tnfrsf6b* در جمعیت کنترل و جمعیت بیمار اختلاف چندانی نداشت، در جمعیت بیمار فراوانی آلل T (۹۴ درصد) و فراوانی آلل C (۶ درصد) و در جمعیت کنترل فراوانی آلل T (۹۸ درصد) و فراوانی آلل C (۲ درصد) بود. آلل C با بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما از لحاظ آماری همراهی معنی‌داری نشان نداد ( $P=0/279$ ).

در این پژوهش ارتباط بین ژنوتیپ‌های TC و CC با خطر ابتلا به MS در جمعیت بیمار و کنترل مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط معنی‌داری در این مورد نیز مشاهده نشد ( $P_{Value_{TC}}=0/268$ ) و ( $P_{Value_{CC}}=1/0$ ). همچنین با توجه به نتایج حاصله هیچ ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و EDSS بیماران در جمعیت مورد مطالعه وجود نداشت ( $P_{Value}=0/65$ ). نتیجه‌گیری کلی نشان داد که بین پلی مورفیسم rs6062314 ژن *tnfrsf6b* و بیماری مالتیپل اسکلروزیس در مردان مبتلا به MS استان خوزستان ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. با وجود این نتیجه‌گیری پیشنهاد می‌گردد مطالعاتی با تعداد نمونه‌های بیشتر از سایر تایپ‌ها صورت گیرد تا همراهی پلی مورفیسم rs6062314 ژن *tnfrsf6b* در تایپ‌های مختلف بیماری MS به‌خوبی بررسی شود. همچنین برای بررسی دقیق‌تر همراهی این پلی مورفیسم با EDSS بیماران مبتلا به MS، مطالعاتی در جمعیت‌هایی با طیف گسترده‌تری از EDSS انجام گیرد و به‌صورت جامع‌تر مورد مطالعه قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

از کلیه بیماران و خانواده‌های آن‌ها که در این مطالعه شرکت نمودند، صمیمانه تشکر می‌نماییم.

### References:

1. Pitti R M, Marsters S A, Lawrence D A, Roy M, Kischkel F C, Dowd P, Godowski P J. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in

روی ۱۳۷۰ بیمار مبتلا به MS و ۱۷۱۵ فرد سالم انجام شد، پلی مورفیسم‌های (*rs4809330*) *tnfrsf6b* و (*rs6684865*) *tnfrsf14* با خطر ابتلا به بیماری MS همراهی نشان داد (۶). TNFRSF6B به خانواده گیرنده فاکتور نکروز تومور تعلق دارد (۱)، اما فاقد دومین گذرنده از غشاء است؛ بنابراین یک پروتئین ترشحی است (۲). TNFRSF6B می‌تواند به اعضای خانواده TNF FasL, LIGHT و TL1A متصل شود و تعامل آن‌ها را با گیرنده‌های مربوطه به‌عنوان مثال Fas، پروتئین واسطه ورود ویروس هرپس (HVEM) و گیرنده محتوی دومین مرگ DR3، مسدود کند (۳-۴). TNFRSF6B نقش واضحی در آپوپتوز دارد. FasL یک مولکول شناخته شده درگیر در آپوپتوز است. LIGHT یک لیگاند برای پروتئین HVEM و LTβR، به‌علاوه یک لیگاند برای TNFRSF6B می‌باشد (۱۰). LIGHT می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌هایی که هر دو پروتئین HVEM و LTβR (۱۱) یا فقط LTβR (۱۲) را بیان می‌کنند، القاء کند. TL1A یک عضو شناخته شده خانواده TNF می‌تواند آپوپتوز را از طریق گیرنده خود، DR3 ایجاد کند (۴).

بافت و سلول‌های طبیعی سطح پایین *tnfrsf6b* را بیان می‌کنند و افراد سالم نزدیک به سطح TNFRSF6B سرم پایه دارند. *tnfrsf6b* در برخی از بافت‌های نرمال از جمله روده بزرگ، معده، طحال، غدد لنفاوی، نخاع، پانکراس و ریه بیان می‌شود (۱۳ و ۱). *tnfrsf6b* عمدتاً در سلول‌های تومور از جمله ریه و سرطان روده (۱)، تومورهای دستگاه گوارش (۱۳) و ویروس‌های مرتبط با لوسمی (۱۴)، بیان بالا دارد.

همچنین بیان آن در بیماری‌های مختلف خودایمنی و التهابی مانند IBD<sup>۱</sup>، SLE<sup>۲</sup> و RA<sup>۳</sup>، افزایش یافته است (۱۶-۱۵). در تحقیق حاضر، ما پلی مورفیسم rs6062314 ژن *tnfrsf6b* را در ۵۰ مرد از بیماران مبتلا به MS که در انجمن MS خوزستان ثبت‌نام کرده بودند و بیماری آن‌ها توسط متخصص نورولوژی تأیید شده بود و ۵۰ مرد سالم به‌عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار دادیم و به‌منظور

lung and colon cancer. Nature 1998;396(6712): 699-703.

2. Zhang J, Salcedo T W, Wan X, Ullrich S, Hu B, Gregorio T, Li Y. Modulation of T-cell responses

<sup>3</sup> Rheumatoid arthritis

<sup>1</sup> Inflammatory bowel disease

<sup>2</sup> Systemic lupus erythematosus

- to alloantigens by TR6/DcR3. *J Clinical Investigation* 2001; 107(11): 1459.
3. Bai C, Connolly B, Metzker M L, Hilliard CA, Liu X, Sandig V, et al. Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(3): 1230-5.
  4. Migone T S, Zhang J, Luo X, Zhuang L, Chen C, Hu B, et al. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immun* 2002; 16(3): 479-92.
  5. Raychaudhuri S, Remmers E F, Lee A T, Hackett R, Guiducci C, Burt N P, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis *Nature genetics* 2008; 40(10): 1216-23.
  6. Blanco-Kelly F, Alvarez-Lafuente R, Alcina A, Abad-Grau MM, de Las Heras V, Lucas M, et al. Members 6B and 14 of the TNF receptor superfamily in multiple sclerosis predisposition. *Genes Immun* 2011;12(2):145-8.
  7. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria." *Ann Neurol* 2005;58(6):840-6.
  8. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33(11):1444-52.
  9. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics* 2013;45(11):1353-60.
  10. Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu GL, et al. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 1998;8(1):21-30.
  11. Zhai Y, Guo R, Hsu TL, Yu GL, Ni J, Kwon BS, et al. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J Clin Invest* 1998;102(6):1142-51.
  12. Rooney IA, Butrovich KD, Glass AA, Borboroglu S, Benedict CA, Whitbeck JC, et al. The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J Biol Chem* 2000;275(19):14307-15.
  13. Bamias G, Kaltsa G, Siakavellas SI, Papaxoinis K, Zampeli E, Michopoulos S, et al. High intestinal and systemic levels of decoy receptor 3 (DcR3) and its ligand TL1A in active ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2010;137(2):242-9.
  14. Funke B, Autschbach F, Kim S, Lasitschka F, Strauch U, Rogler G, et al. Functional characterisation of decoy receptor 3 in Crohn's disease. *Gut* 2009;58(4):483-91.
  15. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, Sleiman PMA, Imielinski M, Guthery SL, et al. Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2008;40(10):1211-5.
  16. Lee C-S, Hu C-Y, Tsai H-F, Wu C-S, Hsieh S-L, Liu L-C, et al. Elevated serum decoy receptor 3 with enhanced T cell activation in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2008;151(3):383-90.

## ASSOCIATION STUDY OF THE RS6062314 POLYMORPHISM IN THE TNFRSF6B GENE IN MEN POPULATION WITH SPORADIC MULTIPLE SCLEROSIS IN KHUZESTAN PROVINCE

Samira Zaidali<sup>1</sup>, Kyumars Safinejad<sup>2\*</sup>, Hamid Galehdari<sup>3</sup>

Received: 17 Sep, 2016; Accepted: 18 Nov, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune, demyelinating and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). The pathogenesis of this disease is still unknown, although there are evidences of environmental factors affecting subjects with genetic predisposition factors. TNFRSF6B protein in human is coded by the tnfrsf6b gene. One of the biological functions of TNFRSF6B is that it acts as death decoy and prevents cell death under certain circumstances. Some examples of studies have shown that rs6062314 (tnfrsf6b) polymorphism is associated with risk of MS. The aim of this study was to investigate the association of rs6062314 polymorphism in tnfrsf6b gene in men population with sporadic multiple sclerosis in Khuzestan province.

**Materials & Methods:** The type of study was case-control and 100 unrelated subjects including 50 patients with low and moderate levels of MS (EDSS  $\leq$  3) and 50 healthy men were enrolled and molecular techniques were used; in addition, extraction of DNA, PCR, and direct sequencing were studied.

**Results:** The genotype and allele frequencies of rs6062314 (tnfrsf6b) between MS patients and controls did not differ significantly (P-value=0.268 and P CC=1.0 and OR = 3.128, 95% CI = 0.61-15.89 for C allele).

**Conclusion:** Our results showed that there was no association between rs6062314 (tnfrsf6b) SNP polymorphism and MS disease.

**Keywords:** Multiple Sclerosis, rs6062314 polymorphism, tnfrsf6b gene, Khuzestan

**Address:** Basic Science College, Broojerd Branch, Islamic Azad University, Broojerd, Iran

**Tel:** +989121510731

**Email:** q\_safinejad@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2017; 27(10): 862 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> M.Sc. Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Basic Science College, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> Professor, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran