

بررسی پلی مورفیسم rs2232365 ژن FOXP3 و ارتباط آن با استعداد ابتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۰ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۴ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۸/۲۵

زمینه و هدف: مولتیپل اسکلروزیس نوعی اختلال التهابی مزمن در سیستم اعصاب مرکزی است که با تخریب غلاف میلین و آسیب نورون‌ها همراه می‌باشد. از طرفی سلول‌های T تنظیمی (Treg) نقش مهمی در کنترل خودایمنی و التهاب دارند. فاکتور نسخه‌برداری ژن FOXP3 (Forkhead box p3) اختصاصی سلول‌های T تنظیمی است که در تکامل و فعالیت مهاری این سلول‌ها، نقش حیاتی دارد. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن FOXP3 در ناحیه rs2232365 با استعداد ابتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی که در فاصله زمانی دی ماه ۱۳۹۳ تا فروردین ۱۳۹۴ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفت، نمونه‌های خون از ۹۰ نفر بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (بیماران بیمارستان افضل‌ی پور کرمان) با الگوهای مختلف بیماری (۴۶ مرد و ۹۴ زن) و ۹۰ فرد سالم (افراد مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون) به عنوان گروه کنترل که از نظر سن و جنس همسان شده بودند، جمع‌آوری گردید و سپس پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2232365 از ژن FOXP3 با تکنیک Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (SSP-PCR) شناسایی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه اختلاف معناداری بین فراوانی ژنوتایپ‌ها در دو گروه بیمار و سالم نشان داد، به طوری که فراوانی ژنوتایپ AA و AG در بیماران بیشتر از گروه کنترل می‌باشد ($P=0/0016$). همچنین فراوانی ژنوتایپ GG در افراد بیمار در مقایسه با گروه کنترل کمتر می‌باشد ($P=0/0018$) و فراوانی آلل A بیشتر از فراوانی آلل G در گروه بیماران در مقایسه با افراد گروه کنترل سالم می‌باشد ($P=0/0018$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که بین پلی مورفیسم rs2232365 در جمعیت مورد مطالعه و استعداد ابتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس ارتباط وجود دارد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، FOXP3، پلی مورفیسم.

رؤیا مهدوی^۱، میترا جمالی^۲

مهدی رستمی‌راد^۳، امین صفاء

عبدالله جعفرزاده^۴، محسن ناصری^{۵*}

- ۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
- ۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.
- ۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
- ۴- گروه ایمونولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.
- ۵- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
- ۶- گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات ژنومیک، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

* نویسنده مسئول: بیرجند، خیابان غفاری، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، گروه پزشکی مولکولی.

تلفن: ۰۵۶-۳۳۳۸۱۱۷

E-mail: naseri_m2003@yahoo.com

مقدمه

بیرونی کرده است. سن شروع آن حدود ۲۰ تا ۴۰ سالگی می‌باشد و شیوع این بیماری در زنان حدود دو برابر بیشتر و زمان شروع علائم نیز در آن‌ها کمی زودتر از مردان است.^۱ شیوع بیماری در برخی نواحی از جمله UK به حدود ۱۰۰ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌رسد.^۲ در ایران و در شهر تهران شیوع مولتیپل اسکلروزیس ۵۱/۹ در ۱۰۰،۰۰۰ نفر و در اصفهان به ۷۱ مورد در ۱۰۰،۰۰۰ و در شهر کرمان

مولتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis, MS) یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی (Central nervous system, CNS) است که به عنوان شایعترین بیماری نورولوژیک بالغین جوان شناخته شده و بروز آن در سال‌های اخیر از روند رو به رشدی در سراسر جهان

یک فاکتور نسخه‌برداری اختصاصی سلول‌های Treg است که در تکامل و عملکرد بخش عمده‌ای از سلول‌های T تنظیمی، نقش حیاتی دارد و باعث تمایز سلول‌های T تنظیمی می‌شود، سلول‌های Treg به‌واسطه تولید سایتوکین‌های ضد التهابی از جمله IL-10، TGFβ و IL-35 نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی و حفظ تحمل محیطی علیه آنتی‌ژن‌ها دارند، از آن‌جا که پلی‌مورفیسم در ژن FOXP3 بر عملکرد و میزان بیان این ژن تأثیر می‌گذارد، از این‌رو در مواردی می‌تواند باعث بروز نقص در عملکرد سرکوب‌کنندگی سلول‌های Treg شود. بنابراین ممکن است وجود پلی‌مورفیسم خاص تعیین‌کننده استعداد ابتلا به بیماری باشد، از آن‌جا که بیماری مولتیپل اسکلروزیس که منجر به دمی‌لینه شدن و تخریب سیستم عصبی می‌شود.^۶

نوع در ژن FOXP3 باعث نقص در تنظیم سیستم ایمنی می‌شود و موتاسیون در ژن یادشده ممکن است منجر به گسترش بیماری‌های خود ایمن می‌شود.^۷

لوکوس FOXP3 در منطقه XP 11.23 قرار دارد که با بسیاری بیماری‌های خودایمن دیگر مانند دیابت نوع یک، پسوریازیس و کرون مرتبط بوده و به عنوان لوکوس خودایمنی هم شناخته شده است،^{۸-۱۱} که می‌تواند دلیلی بر تأیید ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن FOXP3 با بیماری مولتیپل اسکلروزیس و استعداد ابتلا به این بیماری باشد، از آن‌جا که مطالعات اندکی پیرامون پلی‌مورفیسم‌های ژن FOXP3 در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس صورت گرفته و باتوجه به کاهش بیان این پروتیین در این بیماران، از این رو هدف از مطالعه کنونی تعیین فراوانی آلل‌های پلی‌مورفیسم یاد شده در بیماران مبتلا به این بیماری و ارتباط آن با استعداد ابتلا به این بیماری و در نهایت مقایسه این فراوانی با افراد سالم گروه کنترل بود.

روش بررسی

پژوهش حاضر به صورت مورد-شاهدی (Case-control) بوده و از نظر هدف نیز تحقیقات بنیادی-کاربردی به شمار می‌رود که بین سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفت. تعداد نمونه‌های این مطالعه ۱۸۰ نفر شامل ۹۰ فرد بیمار که متشکل از ۵۰ مورد فرد مبتلا به بیماری از نوع عودکننده- بهبود یابنده (RRMS)، ۲۵ فرد مبتلا به بیماری از نوع پیشرونده- ثانویه (SPMS)،

۵۷/۳ در ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش شده است^۳ و شیوع جهانی بیماری حدود یک میلیون مورد در سال می‌باشد.

بر اساس سیر بیماری و بروز علائم این بیماری به انواع مختلفی تقسیم می‌شود. نوع عودکننده- بهبود یابنده (Relapsing-Remitting MS, RRMS)، این بیماران دچار عود و بهبودی بیماری هستند، عود به مواردی گفته می‌شود که افراد دارای MS علائم جدیدی در خود مشاهده می‌کنند و یا علائم پیشین آن‌ها بارز می‌گردد و به اصطلاح عود می‌کند، پیش رونده -اولیه (Primary-Progressive MS (PPMS نوع به نسبت غیرمعمول بیماری است که از همان آغاز فرد مبتلا دچار علائمی می‌شود که پیوسته وخیم‌تر می‌گردد، پیش رونده-ثانویه (Secondary-Progressive MS (SPMS، در این نوع بیماری عوارض ایجاد شده پس از عود بیماری به‌طور کامل برطرف نمی‌شود و میزان ناتوانی همواره افزایش می‌یابد، عودکننده-پیشرونده (Progressive-Relapsing MS (PRMS، نادرترین شکل بیماری است که همراه با حملات حادی است که با عدم بهبودی یا بهبودی بسیار کم توأم می‌باشد. از این بین شایعترین انواع بیماری الگوی RRMS و SPMS می‌باشد.

لنفوسیت‌های T کمک‌کننده (Th) بر اساس الگوی سایتوکاینی حداقل به سه زیرگروه اصلی Th1، Th2 و Th17 تقسیم می‌شوند که واکنش سلول‌های Th1 و Th17 علیه آنتی‌ژن‌های میلین خودی، منجر به بروز التهاب در CNS می‌شود.^۴

زیرگروهی از سلول‌های FOXP3، CD25+، TCD4+ که دارای عمل سرکوب‌کنندگی پاسخ‌های ایمنی و حفظ تحمل به خود هستند تحت عنوان سلول‌های T تنظیم‌کننده (Treg) وجود دارند که در کنترل اتوایمنی و جلوگیری از تخریب وابسته به سلول T میلین‌ها نقش دارند. آنالیز فنوتیپی، بیانگر کاهش سلول‌های Treg در فاز تشدید بیماری بوده و عمل سرکوب‌کنندگی این سلول‌ها در بیماران مولتیپل اسکلروزیس به شدت کاهش می‌یابد.^۵ سلول‌های Treg نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، حفظ تحمل و ممانعت از بیماری‌های خودایمن دارند. بنابراین تغییر در تعداد یا عملکرد آن‌ها می‌تواند در بروز خود ایمنی‌ها موثر باشد. یکی از عوامل مهم که در تنظیم گسترش و عملکرد سلول‌های Treg نقش مهمی دارد ژن FOXP3 (Forkhead box p3) می‌باشد که تنوع یا موتاسیون در آن باعث نقص در عملکرد تنظیمی سلول‌های Treg می‌شود. FOXP3

شد و از نمونه‌هایی که خلوص بیشتری داشتند ($2 < 260/280$ OD $< 1/8$) جهت استفاده در فرآیند Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (SSP-PCR) استفاده شد.

برای انجام ژنوتایپ و تعیین پروفایل پلی مورفیسم (ناحیه rs2232365) مرتبط با FOXP3، از توالی پرایمر با طول 442bp: A و 427bp: G (MWG-biotech AG, Ebersberg, Germany) ^{۱۳} و از ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR) به عنوان کنترل داخلی (Internal Control) استفاده گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Veriti™ Thermal Cyclers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) و تحت شرایط دمایی و زمانی مشخص انجام گردید (جدول ۲).

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ در بافر TAE1X به مدت ۲۵ دقیقه در ولتاژ ثابت ۱۸۰ ولت الکتروفورز گردیده و سپس ژل مربوطه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) قرار گرفته و در دستگاه ژل داگ (مدل دستگاه: E-BOX-M20.5VX) مشاهده گردید. در تکنیک SSP-PCR با انتقال محصول PCR روی ژل و بررسی بودن یا نبودن باند در هر یک از جفت میکروتیوب مربوط به یک نمونه DNA با پرایمرهای Forward متفاوت، از نظر نوکلئوتید انتهای 3' می‌توان به‌طور مستقیم ژنوتایپ نقطه مورد نظر را به‌دست آورد.

اگر در میکروتیوب Wild (حاوی پرایمر Wild) واکنش PCR رخ دهد ژنوتایپ فرد در منطقه rs2232365 به‌صورت هموزیگوت A است و اگر میکروتیوب Mutant (حاوی پرایمر Mutant) از نظر باند محصول PCR مثبت باشد ژنوتایپ از نوع هموزیگوت G و در صورت حضور باند در هر دو میکروتیوب Wild و Mutant نشان‌دهنده ژنوتایپ هتروزیگوت AG فرد در منطقه مورد نظر است. گفتنی است که برای کنترل انجام پروسه PCR در هر دو میکروتیوب از ژن‌های کنترل داخلی PCR که در تمام واکنش‌ها باید مثبت باشد استفاده می‌شود که در این پژوهش از ژن Epidermal growth factor receptor (EGFR) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق نرم‌افزارهای SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) و با استفاده از آزمون‌های آماری Chi-square test، Independent t-test و آنالیز واریانس (ANOVA χ^2) انجام پذیرفت و سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۱۰ فرد مبتلا به بیماری از نوع پیش‌رونده-اولیه (PPMS) و پنج فرد مبتلا به بیماری از نوع عود کننده-پیش‌رونده (PRMS) و ۹۰ نفر هم افراد سالم به عنوان گروه کنترل بود. نمونه‌های بیماران از بیماران مراجعه‌کننده به بخش اعصاب بیمارستان شفاي شهر کرمان بود که با تشخیص اولیه بیماری مولتیپل اسکلروزیس بر اساس علائم بالینی و تشخیص نهایی با تصویربرداری به روش تشدید مغناطیسی (Magnetic resonance imaging, MRI) توسط پزشک متخصص مغز و اعصاب، وارد مطالعه شدند.

معیارهای ورود به مطالعه ابتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس بود و معیارهای خروج از مطالعه عدم ابتلا به دیگر بیماری‌های خود ایمن (به جز مولتیپل اسکلروزیس) و همچنین بیماری‌های التهابی دیگر بود. نمونه‌های کنترل از بین افراد سالم مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون کرمان انتخاب شدند و معیارهای خروج از مطالعه ابتلا به بیماری‌های اتوایمیون، بیماری‌های قلبی-عروقی، بیماری‌های کبدی، بیماری‌های نقص ایمنی، عفونت، درمان با مهارکننده‌های سیستم ایمنی در طی شش ماه گذشته بود. به افراد مورد مطالعه در مورد هدف از پژوهش و هدف موردنظر توضیحات کافی داده شد و رضایت کلیه بیماران و افراد سالم پیش از نمونه‌گیری دریافت گردید. داده‌های مورد نیاز در هر دو گروه بر اساس پرسشنامه‌هایی که به همین منظور طراحی شده بود جمع‌آوری گردید.

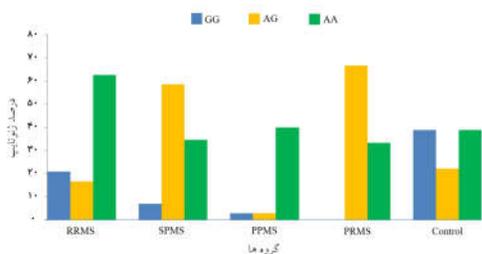
بدیهی است که نمونه‌های گروه بیماران و گروه کنترل همگن انتخاب شده و نسبت زن و مرد در دو گروه مساوی انتخاب شد و همچنین دو گروه مورد مطالعه در یک رنج سنی بوده و میانگین سنی و انحراف معیار آن نیز هم‌خوانی داشتند. جمع‌آوری نمونه‌ها به روش ساده انجام گرفت به این ترتیب که در مورد نمونه‌های بیماران پس از تأیید نهایی ابتلا به مولتیپل اسکلروزیس توسط پزشک متخصص، داده‌های بیمار از طریق پرسشنامه دریافت گردید و خون‌گیری توسط تکنسین آزمایشگاه انجام شد.

همچنین از نمونه‌های CBC (حاوی ضد انعقاد EDTA) نیز استخراج DNA (پس از سانتی‌فوژ در دور ۲۷۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه) به شیوه نمک‌زدایی به‌عمل آمد. ^{۱۲} با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موجی که DNA بیشترین جذب نوری را دارد) به ۲۸۰ نانومتر (طول موجی که پروتئین بیشترین جذب نوری را دارد) اندازه گرفته

یافته‌ها

جدول ۳: فراوانی ژنوتایپ‌ها و آلل‌های پلی‌مورفیسم rs2232365 در ژن FOXP3

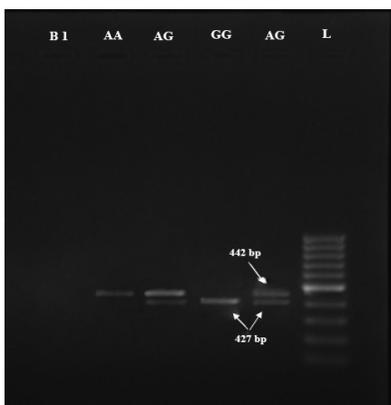
ژنوتایپ	تعداد و درصد بیماران مولتیپل اسکلروزیس	تعداد و درصد افراد سالم گروه کنترل
AA	۵۰٪ (۴۵)	۳۵٪ (۳۸/۹)
AG	۳۰٪ (۳۳/۳)	۲۰٪ (۲۲/۲)
GG	۱۵٪ (۱۶/۷)	۳۵٪ (۳۸/۹)
A	۱۲۰٪ (۶۶/۶)	۵۰٪ (۹۰)
G	۶۰٪ (۳۳/۴)	۵۰٪ (۹۰)



نمودار ۱: بررسی پلی‌مورفیسم ژن FOXP3 در بیماران مبتلا به مولتیپل

اسکلروزیس بر اساس الگوی بیماری

RRMS=Relapsing- Remitting MS, PPMS=Primary-Progressive MS
SPMS=Secondary-Progressive MS, PRMS=Progressive-Relapsing MS



شکل ۱: نتایج الکتروفورز SSP-PCR محصول ژن FOXP3

L: لدر (مارکر) ۱۰۰ جفت بازی، GG: افراد هموزیگوت برای آلل G، AG: افراد هتروزیگوت، AA: افراد هموزیگوت برای آلل A، B1: کنترل منفی، در میکروتیوب حاوی پرایمر Wild ژنوتایپ به صورت هموزیگوت A می‌باشد، در میکروتیوب حاوی پرایمر Mutant ژنوتایپ به صورت هموزیگوت G می‌باشد و در میکروتیوب با هر دو پرایمر Wild و Mutant، ژنوتایپ به صورت هتروزیگوت AG می‌باشد.

فراوانی ژنوتایپ‌های AA، AG، GG و همچنین آلل‌های A و G مربوط به پلی‌مورفیسم rs2232365 در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که فراوانی ژنوتایپ AA و AG در بیماران بیشتر از گروه کنترل می‌باشد (P=۰/۰۰۱۶). همچنین فراوانی ژنوتایپ GG در افراد بیمار در مقایسه با گروه کنترل کمتر می‌باشد (P=۰/۰۰۱۸) و فراوانی آلل A بیشتر از فراوانی آلل G در گروه بیماران در مقایسه با افراد گروه کنترل سالم می‌باشد (P=۰/۰۰۱۸) (نمودار ۱)، همچنین بر اساس ژنوتایپ و آلل‌های مربوطه در ناحیه rs2232365 بین بیماران

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش SSP-PCR و سکانس پرایمر کنترل

داخلی (IC) از ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) با طول ۲۸۳ bp

5'-CCAGCTCAAGAGACCCCG-3'	آغازگر رفت
5'-GCTATTGTAACAGTCTGGCAAGTG-3	آغازگر برگشت
5'-CCCAGCTCAAGAGACCCCA-3	آغازگر رفت
5'-GGGCTAGTGAGGAGGCTATTGTAAC-3'	آغازگر برگشت
5'TGGGCCATGTCTGGCACCTGC3'	آغازگر رفت
	(گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی)
5'ACAGCTTGAAGGACTCTGG3'	آغازگر برگشت
	(گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی)

جدول ۲: برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به تکثیر قطعات (rs2232365)

در ژن FOXP3

Time	Temperature (°C)	Cycle
۴ min	۹۴	سیکل اول: واسرشت سازی
۳۰ sec	۹۴	واسرشت سازی
۳۰ sec	۶۲	اتصال پرایمر
۴۰ sec	۷۲	طول‌سازی
		تکثیر قطعات (۳۰ سیکل)
۵ min	۷۲	طول‌سازی انتهایی

محدودی در زمینه ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن FOXP3 با بیماری مولتیپل اسکلروزیس صورت گرفته است، ابتدا به بررسی مطالعات پلی مورفیسم این ژن در سایر بیماری‌های خود ایمن و سپس بیماری مولتیپل اسکلروزیس پرداخته شد. در مطالعه‌ای که توسط Inoue و همکاران بر روی پلی مورفیسم ژن FOXP3 در مبتلایان به گریوز (Graves' Disease, GD) طراحی شد نتایج مشابهی به دست آمد، نتایج گویای آن بود که در ۱۱/۳٪ از بیماران گریوز (GD مقاوم) که ژنوتایپ AA3279- را داشتند، میزان بیان ژن FOXP3 به کمترین مقدار در مقایسه با سایر ژنوتایپ‌ها می‌رسید و این در حالی است که این ژنوتایپ در بیمارانی که فاز بهبودی را طی می‌کردند یافت نشد. همچنین فراوانی ژنوتایپ 924AG- در این گروه از بیماران نسبت به مبتلایان به GD مقاوم بیشتر بود. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که افراد با ژنوتایپ AA دارای سلول‌های Treg با فعالیت سرکوب‌کنندگی ضعیف‌تر می‌باشند.^{۱۸،۱۷}

در مطالعه Paradowska و همکارانش، نتایج به دست آمده نشان داد که ژنوتایپ 924G- با شدت بیماری آرتریت روماتوئید ارتباط مستقیم دارد.^{۱۹} مطالعه Lan و همکاران ارتباط معناداری بین استعداد ابتلا به بیماری لوپوس با پلی مورفیسم ژن FOXP3 مشاهده گردید.^{۲۰} در مطالعه Venken و همکاران، کاهش بیان FOXP3 در مایع مغزی- نخاعی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس نسبت به افراد سالم مشاهده شد.^{۲۱} این یافته‌ها نشان می‌دهد که پلی مورفیسم یادشده در پاتوژنز این بیماری نقش داشته است و تایید کننده این مطلب است که کاهش بیان FOXP3 در سلول‌های Treg در پاتوژنز این بیماری دخیل است، برخلاف نتایج مطالعات پیشین، همسو با مطالعه Rahnama و همکارانش این نتیجه حاصل شد که پلی مورفیسم rs3761549 ژن FOXP3 با استعداد ابتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس ارتباطی ندارد،^۶ همچنین Gao و همکارانش، نتیجه گرفتند که پلی مورفیسم‌های ژن FOXP3 در نواحی 6054- و 924- با ریسک ابتلا به بیماری خودایمن پسونیازیس ارتباط معناداری ندارند،^{۲۲} تناقض در این نتایج می‌تواند به دلیل متفاوت بودن جمعیت مورد مطالعه و همچنین تفاوت‌های ژنتیکی افراد، تفاوت در معیارهای انتخاب نمونه و تعداد نمونه‌ها باشد. نتایج مطالعه Jafarzadeh و همکارانش که بر روی تعدادی دیگر از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس در استان کرمان صورت گرفت، نتایجی مشابه با پژوهش

مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس با الگوهای متفاوت بیماری، تفاوت معناداری در فراوانی ژنوتایپ‌ها دیده شد. فراوانی ژنوتایپ AG در بیماران با الگوی بیماری پیشرونده- ثانویه نسبت به گروه کنترل بیشتر بود ($P=0/002$)، همچنین فراوانی ژنوتایپ GG و آلل G در بیماران با الگوی بیماری مشابه نسبت به گروه کنترل کمتر می‌باشد، هر دو این تفاوت از نظر آماری معنادار بود ($P=0/0007$ و $P=0/0017$) و فراوانی ژنوتایپ AA بیماران با الگوی بیماری عودکننده- فروکش کننده نسبت به گروه کنترل بیشتر بود و این تفاوت از نظر آماری معنادار بود ($P=0/0018$) همچنین فراوانی آلل A در بیماران با الگوی بیماری عودکننده- فروکش کننده و پیشرونده- اولیه بیشتر از گروه کنترل بود و تفاوت از نظر آماری معنادار بود به ترتیب ($P=0/043$ و $P=0/0015$).

بحث

اگرچه علت دقیق بیماری مولتیپل اسکلروزیس مشخص نشده است اما مطالعات مختلف نشان داده است که سلول‌های سیستم ایمنی در بروز آن دارای نقش موثری هستند، از جمله نقش FOXP3 که فاکتور رونویسی Treg می‌باشد به طوری که موتاسیون در ژن FOXP3 ممکن است منجر به گسترش بیماری‌های خودایمن از جمله مولتیپل اسکلروزیس شود.^{۱۵،۱۴} افراد مبتلا به این بیماری دارای ناهنجاری در پیام‌رسانی و بیان FOXP3 در سلول‌های Treg هستند. کاهش FOXP3 باعث نقص در تنظیم ایمنی به وسیله سلول‌های Treg شده که ممکن است در بروز بیماری مولتیپل اسکلروزیس نقش داشته باشند.^{۱۴}

پلی مورفیسم ژن FOXP3 به ویژه در ناحیه 924- (rs2232365) با بسیاری از بیماری‌های خودایمن در ارتباط است. در مطالعه یادشده که به صورت مورد-شاهدی طراحی شد، ۹۰ نفر فرد بیمار و ۹۰ نفر فرد سالم را به عنوان گروه شاهد از نظر فراوانی پلی مورفیسم ژنوتایپ‌های AA، AG و GG را در ژن FOXP3 بررسی کردیم. مطالعه ما نشان داد ژنوتایپ AA مرتبط با rs2232365 در کاهش تولید FOXP3 نسبت به دو ژنوتایپ دیگر AG و GG نقش دارد و بیماران با ژنوتایپ AA دارای کاهش سلول‌های Treg و یا با عملکرد تضعیف شده سرکوب‌کنندگی هستند.^{۱۶} از آنجا که مطالعات

کسب آگاهی‌های بیشتر در زمینه سایر پلی‌مورفیسم‌های FOXP3 و ارتباط آن با بیماری مولتیپل اسکلروزیس و سایر بیماری‌های خودایمن نیاز به پژوهش‌های بیشتر در جمعیت‌ها و قومیت‌های مختلف ایرانی می‌باشد، به‌علاوه بررسی هاپلوتایپ‌های HLA نیز می‌تواند کمک کننده باشد. از آنجایی که در ناحیه rs2232365 فراوانی ژنوتایپ‌های AA و AG بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری بالاتر و در مقابل فراوانی ژنوتایپ GG در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری کمتر بود، بنابراین به نظر می‌رسد آلل A در استعداد ابتلا به بیماری نقش داشته باشد.

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله، کمال تشکر و قدردانی را از همکاری سازمان انتقال خون کرمان و سرکار خانم مهناز محمدی زاده کارشناس آزمایشگاه گروه هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان را اعلام می‌دارد.

ما داشت و نشان داد که پلی‌مورفیسم در ناحیه 3279- ژن FOXP3 با ریسک ابتلا به این بیماری ارتباط مستقیمی دارد و فراوانی ژنوتایپ‌های AA و AC در بیماران مبتلا به بیماری نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری بالاتر می‌باشد.^{۳۳} بنابراین بیشتر نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که آلل A در ناحیه rs2232365 می‌تواند به عنوان یک ریسک فاکتور نهفته برای ابتلا به اکثر خودایمنی‌ها چه در زنان و چه در مردان در نظر گرفته شود، چرا که بیشتر پلی‌مورفیسم‌های FOXP3 در ناحیه DNA متصل شونده به فاکتورهای رونویسی (به‌خصوص GATA3) قرار دارد که این پلی‌مورفیسم‌ها می‌تواند منجر به نقص در رونویسی FOXP3 و در نتیجه نقص عملکرد سلول‌های Treg شود. این بررسی نقش مهمی در درک مکانیسم‌های ایمنی در بیماری مولتیپل اسکلروزیس داشته و می‌تواند در طراحی پروتکل‌های تشخیصی درمانی و پیش‌آگهی بیماری مورد استفاده قرار گیرد. در نتیجه با توجه به شباهت‌های مطالعه مذکور با سایر مطالعات، جهت

References

- Inglese M. Multiple sclerosis: new insights and trends. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27(5):954-7.
- Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104(3):182-91.
- Sahraian MA, Khorramnia S, Ebrahim MM, Moifar 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.
- Ahlgren C, Torén K, Odén A, Andersen O. A population-based case-control study on viral infections and vaccinations and subsequent multiple sclerosis risk. *Eur J Epidemiol* 2009;24(9):541-52.
- Park O, Grishina I, Leung PS, Gershwin ME, Prindiville T. Analysis of the Foxp3/scurfin gene in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:218-28.
- Rahnama R, Mansouri R, Valizadeh H, Rahimdel A, Eslami G. Investigating Prevalence of FOXP3 gene polymorphism in multiple sclerosis. *SSU J* 2015;22(6):1604-11.
- Lin W, Truong N, Grossman WJ, Haribhai D, Williams CB, Wang J, et al. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(5):1106-15.
- Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, et al. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 1996;13(4):472-6.
- Imrie H, Vaidya B, Perros P, Kelly WF, Toft AD, Young ET, et al. Evidence for a Graves' disease susceptibility locus at chromosome Xp11 in a United Kingdom population. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(2):626-30.
- Cornélis F, Fauré S, Martínez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C, et al; ECRAF. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(18):10746-50.
- Taylor JC, Gough SC, Hunt PJ, Brix TH, Chatterjee K, Connell JM, et al. A genome-wide screen in 1119 relative pairs with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(2):646-53.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
- Li D, Song L, Fan Y, Li X, Li Y, Chen J, et al. Down-regulation of TIPE2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2009;133(3):422-7.
- Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 2005;81(1):45-52.
- Nguyen LT, Jacobs J, Mathis D, Benoist C. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56(2):509-20.
- Wu Z, You Z, Zhang C, Li Z, Su X, Zhang X, et al. Association between functional polymorphisms of Foxp3 gene and the occurrence of unexplained recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population. *Clin Develop Immunol* 2011;2012.
- He Y, Na H, Li Y, Qiu Z, Li W. FoxP3 rs3761548 polymorphism predicts autoimmune disease susceptibility: a meta-analysis. *Hum Immunol* 2013;74(12):1665-71.
- Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R, Akamizu T, Tatsumi K, et al. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2010;162(3):402-6.
- Paradowska-Gorycka A, Jurkowska M, Felis-Giemza A, Romanowska-Próchnicka K, Manczak M, Maslinski S, et al.

- Genetic polymorphisms of Foxp3 in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2015;42(2):170-80.
20. Lan Y, Tang XS, Qin J, Wu J, Qin JM. Association of transcription factor FOXP3 gene polymorphism with genetic susceptibility to systematic lupus erythematosus in Guangxi Zhuang population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2010;27(4):433-6.
 21. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, et al. Compromised CD4⁺ CD25^{high} regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* 2008;123(1):79-89.
 22. Gao L, Li K, Li F, Li H, Liu L, Wang L, et al. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *J Dermatol Sci* 2010;57(1):51-6.
 23. Jafarzadeh A, Jamali M, Mahdavi R, Ebrahimi HA, Hajghani H, Khosravimashizi A, et al. Circulating levels of interleukin-35 in patients with multiple sclerosis: evaluation of the influences of FOXP3 gene polymorphism and treatment program. *J Mol Neurosci* 2015;55(4):891-7.

FOXP3 polymorphism rs2232365 and its association with multiple sclerosis susceptibility

Roya Mahdavi M.Sc.¹
Mitra Jamali M.Sc.²
Mehdi Rostami Rad Ph.D.³
Amin Safa M.Sc.⁴
Abdollah Jafarzadeh Ph.D.⁵
Mohsen Naseri Ph.D.^{6*}

1- Department of Immunology,
School of Allied Medical Sciences,
Birjand University of Medical
Sciences, Birjand, Iran.

2- Department of Immunology,
School of Medicine, Kerman
University of Medical Sciences,
Kerman, Iran.

3- Department of Microbiology,
School of Medicine, Tehran
University of Medical Sciences,
Tehran, Iran.

4- Department of Immunology,
School of Allied Medical Sciences,
Zabol University of Medical
Sciences, Zabol, Iran.

5- Department of Immunology,
School of Medicine, Rafsanjan
University of Medical Sciences,
Rafsanjan, Iran.

6- Department of Molecular
Medicine, Genomic Research
Center, Birjand University of
Medical Sciences, Birjand, Iran.

* Corresponding author: Department of
Molecular Medicine, Genomic Research
Center, Birjand University of Medical
Sciences, Ghafari Ave., Birjand, Iran.
Tel: +98- 56- 32381617
E-mail: naseri_m2003@yahoo.com

Abstract

Received: 10 Sep. 2016 Revised: 09 Nov. 2016 Accepted: 14 Nov. 2016 Available online: 15 Nov. 2016

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disorder of the CNS characterized by destruction of the myelin sheath, gliosis and progressive neurological dysfunction. The regulatory T (Treg) cells play a major role in the control of the autoimmunity and inflammation. The forkhead box p3 (FOXP3) is a central molecule in the function of Treg cells that play an important role in the immunoregulation. The aim of this study was to investigate single nucleotide polymorphism (SNP), rs2232365, in FOXP3 gene in patients with multiple sclerosis.

Methods: In a case-control study, peripheral blood samples were collected from 90 patients with MS (46 men and 94 women with different patterns of disease) from January 2014 to April 2015 in the Afzalipoor Hospital, Kerman (a city located in the southeast of Iran). In a total, 90 healthy subjects were also enrolled into the investigation as a control group. The healthy subjects were recruited among blood donations of the Kerman Transfusion Organization and interviewed regarding CNS disease, and none of them had any history of CNS diseases or other relevant disorders. The SNP rs2232365 in FOXP3 gene was assessed by single specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR) method. Finally, statistical analysis was performed using SPSS version 22 (Chicago, IL, USA).

Results: In both patients and healthy control groups, there was significant difference among subjects with GG, AG, and AA genotypes at rs2232365 in FOXP3 gene. The frequencies of AA and AG genotypes at rs2232365 in the FOXP3 gene were significantly higher in MS group as compared with healthy subjects ($P < 0.002$). Moreover, the frequency of GG genotype was significantly lower in the MS group in comparison with healthy control subjects ($P < 0.002$). The frequency of A allele was significantly higher whereas the frequency of G allele was significantly lower in MS patients as compared with healthy subjects ($P < 0.001$).

Conclusion: The results of the present study suggest that SNP rs2232365 may influence the susceptibility to multiple sclerosis. Therefore, SNP rs3761548 may directly or indirectly alter the level of the FOXP3 protein expression in Treg cells.

Keywords: FOXP3, multiple sclerosis, polymorphism.