



## بررسی میزان بیان RNA غیرکدکننده بلند *GAS8-ASI* و ژن هدف *GAS8* در بیماران مالتیپل اسکلروزیس

منا پاطوقی<sup>۱</sup>، سوده غفوری‌فرد<sup>۲\*</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
 ۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
 \*مسئول مکاتبات: s.ghafourifard@sbmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۶

### چکیده

بیان ژن مهار رشد اختصاصی ۸ (*GAS8*) و RNA آنتی‌سنس طبیعی آن (*GAS8-ASI*) در بافت‌های توموری با منشأ مختلف ارزیابی شده است. با این حال، ارتباط آنها با اختلالات مرتبط با ایمنی خیلی درک نشده است. در مطالعه حاضر، ما سطح بیان این ژنها را در ۵۰ بیمار مبتلا به فرم عودکننده-بهبود یابندهی مالتیپل اسکلروزیس (RRMS) با گروه کنترل افراد سالمی که از لحاظ سن و جنس همسان‌سازی شده بودند، ارزیابی کردیم. سنجش بیان بر نمونه‌های خون محیطی افراد شرکت‌کننده در آزمایش صورت گرفت. استخراج RNA کل از خون و سنتز cDNA از خون انجام شد، سپس با روش Taq-man PCR و با طراحی پرایمر و پروب‌های اختصاصی سنجش صورت گرفت. بیان هر دو ژن در مقایسه با کنترل‌ها به صورت چشم‌گیری افزایش یافت (به ترتیب  $p = ۰/۰۰۱$  و  $p < ۰/۰۰۰۱$ ). تفاوت در بیان *GAS8* نیز در کل بیماران زن و زنان کمتر از ۵۰ سال در مقایسه با افراد کنترل مربوطه معنی‌دار بود (به ترتیب  $p = ۰/۰۰۲$  و  $p = ۰/۰۰۶$ ). بیان *GAS8-ASI* در بیماران مرد در هر دو زیرگروه مبتنی بر سن در مقایسه با افراد سالم مربوطه بالاتر بود ( $p = ۰/۰۰۰۱$ ). بیان هر دو ژن در گروه مردان با سن شرکت‌کنندگان رابطه معکوس داشت اما این ارتباط با هیچ زیرگروه دیگری وجود نداشت. مطالعه حاضر اهمیت *GAS8* و *GAS8-ASI* را در بیماری‌زایی MS و نقش فرضی *GAS8-ASI* به عنوان یک نشانگر تشخیصی در زیرمجموعه‌های بیماران نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: *GAS8*، *GAS8-ASI*، مالتیپل اسکلروزیس، بیان ژن.

### مقدمه

عودکننده-بهبودیابنده و ثانویه است که به تدریج باعث نقص سیستم عصبی مرکزی می‌شود. MS یک بیماری مولتی فاکتوریال می‌باشد، بدین مفهوم که علل ژنتیکی و محیطی مختلفی، در القای بیماری دخیل می‌باشند. به طور گسترده، این نظریه مورد قبول است

بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) به عنوان یک اختلال دمییلینه‌کنندهی سیستم اعصاب مرکزی با تغییر چندین مولکول و مسیرهای سیگنالینگ در خون و سیستم اعصاب مرکزی در نظر گرفته می‌شود (۳). MS دارای یک دوره پاتولوژیک ابتدایی، فاز



نشان می‌دهند، مرتبط با مسیر پیام‌رسانی آپاپتوز بوده- اند (۱).

بنابراین، نقص در بیان ژن‌های آپاپتوز می‌تواند سبب افزایش احتمال و مستعد ساختن لنفوسیت‌های فعال برای القای حمله شدید و ایجاد التهاب مزمن در بیماران RRMS شود. در مطالعه توسط Achiron و همکاران، بیان ژن‌های دخیل در آپاپتوز در سلول‌های خون محیطی تک هسته‌ای‌ها (PBMC) در بیماران مبتلا به RRMS در حین عود بیماری در مقایسه با بیماران در فاز خاموشی با استفاده از ریزآرایه Affymetrix مقایسه شد. بیان ۱۵۷۸ ژن به طرز معنی-داری با عود بیماری در ارتباط بودند که اکثر این ژن‌ها در مسیر آپاپتوز قرار دارند (۹).

در بین ژن‌هایی که با آپاپتوز در ارتباط هستند، می‌توان به GAS8 اشاره کرد، زیرا در همولوگ موش به عنوان یک ژن سرکوبگر توموری شناخته شده است و بیان آن در تعدادی از سرطان‌ها دچار تغییر شده است. GAS8 به طور مرتب در سرطان‌های پستان و پروستات حذف می‌شود (۱۲).

علاوه بر این، محصول پروتئینی تولید شده به وسیله‌ی این ژن در طول تقسیم سلولی به میکروتوبول‌ها متصل گردیده و در عملکرد داینین (در کمپلکس نکسین-داینین) و کنترل آن نقش دارد (۲).

GAS8 در دستگاه گلژی قرار گرفته است که این جایگاه وابسته به میکروتیوب‌های کامل است و توسط سیکل سلولی تنظیم می‌شود. در طول میتوز این پروتئین در میان سیتوپلاسم پراکنده می‌شود (۲).

LncRNAs یا RNA های غیر کدکننده‌ی بلند دارای طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند و در مسیرهای مختلف زیستی نقش دارند در زمان فعال شدن پاسخ ایمنی ذاتی و همچنین در زمان توسعه و تمایز و فعال شدن سلول‌های T تغییرات وسیعی در بیان lncRNAs ها صورت می‌گیرد (۴).

که MS، یک اختلال دمیالینه‌کننده است که سیستم ایمنی به میلین حمله کرده و سبب نورودژنراسیون می‌شود (۷).

از علل این عارضه این مطلب را باید مد نظر قرار داد که این بیماری به عنوان رایج‌ترین نقص کارکردی در افراد جوان بدون جراحی و زخم خاص به شمار می-آید به طوری که عمر متوسط مبتلایان ۵ سال کاهش یافته و ناتوانی مزمن در انجام امور زندگی مهمترین مشکل بیماری می‌باشد. بیماری اسکروز چندگانه یکی از بیماری‌های پیچیده بوده و یک پروسه التهابی است که طی آن سلول‌های T (autoreactive) به میلین واکنش نشان می‌دهند و سبب از بین رفتن ماده سفید مغز و نخاع می‌شوند. در بروز این بیماری عوامل محیطی و ژنتیکی هر دو به موازات یکدیگر دارای تاثیر عمده‌ای می‌باشند.

بهترین فرضیه مورد تایید در بیماری MS، این است که سلول‌های T و سلول‌های autoreactive B سبب القای آسیب به میلین، التهاب و تخریب عصبی می-شوند (۷).

در بین علل و فاکتورهایی که به نظر می‌رسد در ایجاد MS، ایفای نقش می‌کنند، نقش پررنگ فاکتورهای ژنتیکی، غیرقابل انکار است. یکی از علل پررنگ دخیل در پاتوژنز MS، عدم تمایل سلول‌های T برای انجام آپاپتوز می‌باشد. عدم توانایی سیستم ایمنی برای حذف لنفوسیت‌های Self-reactive، به علت وجود نقص در ماشین مرگ سلولی است. بنابراین، نقص در مکانیسم‌های سیگنالینگ مرتبط با فرایند آپاپتوز، می-تواند یکی از علل بروز حملات ام اس شود (۱۳).

بر اساس تحقیقی که بر روی بیماران RRMS با استفاده cDNA gene microarrays انجام شد، نشان داده شد که بیش از ۸۰ درصد از ژن‌هایی که بین بیماران درمقایسه با گروه سالم، تفاوت بیان معنی‌دار



RRMS و همچنین ۵۰ نفر فرد سالم از نظر بیماری MS و سایر بیماری‌های اتوایمیون و عصبی را به طور تصادفی انتخاب کردیم و پس از توضیح هدف تحقیق به آنان و جلب رضایت آنها برای شرکت در تحقیق، ۵ سی‌سی خون وریدی گرفته شد و در لوله حاوی EDTA (Ethylene Diamine Tetra Aceticacid) جمع‌آوری و در یخچال نگهداری شد. نمونه‌های سالم و بیمار از لحاظ سن و جنس همسان‌سازی شدند. نمونه‌های بیماران از بیمارستان فرشچیان همدان جمع‌آوری شد و در آزمایشگاه ژنتیک گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه شهید بهشتی مراحل زیر روی نمونه‌ها صورت گرفت.

**اطلاعات کلینیکی و پاراکلینیکی بیماران MS:** مدت بیماری به طور میانگین ۵ سال بوده است. EDSS این بیماران به طور میانگین ۳/۰۷ بوده است. سن شروع بیماری در بیماران MS به طور میانگین ۳۱/۴۸ سال بوده است. تمامی بیماران فرم Relapsing-remitting بوده و دوره‌های فروکش را تجربه کرده‌اند. مشخصات بالینی بیماران در جدول ۱ آورده شده است.

**توزیع جنسیتی دو گروه بیمار و کنترل:** از ۵۰ بیمار پاسخ دهنده به درمان مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس ۳۵ نفر زن و ۱۵ نفر مرد بوده‌اند. در گروه کنترل ۳۵ نفر زن و ۱۵ نفر مرد وجود داشته است.

**توزیع سنی دو گروه بیمار و کنترل:** میانگین سنی گروه کنترل  $35/3 \pm 2/4$  سال و در بازه سنی ۳۱-۵۵ بوده است. میانگین سنی گروه بیمار  $36/2 \pm 2/7$  بوده و در بازه سنی ۳۰-۴۵ سال بوده‌اند. برای تطابق میانگین سن در گروه بیمار و کنترل آزمون t-test صورت گرفت و تفاوت معنی‌داری بین بیماران و کنترل وجود نداشت.

جدول ۱ مشخصات جمعیتی (دموگرافیک) دو گروه بیمار و کنترل را نشان می‌دهد.

مطالعات عملکردی در رده‌های سلولی PTC (Papillary Thyroid Carcinoma) نقش این lncRNA را در سرکوب تقسیم سلولی و القای اتوفاژی نشان می‌دهد (۸).

نقش *GAS8* و *GAS8-ASI* در سرطان کبد نیز ارزیابی شده است. افزایش میزان *GAS8-ASI* در هنگام افزایش بیان *GAS8* مشاهده شده است که از طریق حفظ کانفورماسیون کروماتین فعال در پروموتور *GAS8* نقش خود را ایفا کرده و باعث سرکوب تقسیم سلولی می‌شود (۸).

در این مطالعه ما به بررسی بیان ژن‌های *GAS8* و *GAS8-ASI* در خون بیماران RRMS پرداختیم. با توجه به اتیولوژی نامعلوم بیماری MS و نقش مشترک فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در این بیماری ما به دنبال بیومارکرهای جدید در این بیماری بودیم تا با توجه به آن تشخیص و درمان در این بیماران را تسریع و بهبود ببخشیم. بنابراین بر آن شدیم تا با این مطالعه در قالب یک بررسی مورد-شاهدی با ارزیابی بین ارتباط ژن‌های مذکور با بروز بیماری MS بین بیماران مبتلا به MS در مقایسه با گروه کنترل سالم می‌پردازیم.

#### مواد و روش‌ها

**روش نمونه‌گیری و تعداد نمونه:** بیماران MS بر اساس معیارهای Mc Donald (۱۰) توسط نورولوژیست تشخیص داده شدند. و افرادی که حامل آلل  $HLA-DRB1*15$  (طبق مطالعات شایعترین آلل مستعد کننده بیماری) بودند از مطالعه حذف شدند و فقط بیماران فاقد این آلل در مطالعه وارد شدند. تمامی بیماران فرم Relapsing Remitting بیماری را داشتند که در زمان تهیهی نمونه در فاز remission بیماری خود بوده‌اند. تمام بیماران از اینترفرون بتا به عنوان دارو استفاده کرده‌اند. ۵۰ نفر بیمار مبتلا به



**Real-Time PCR**: با استفاده از روش Taq-man PCR به بررسی کمی بیان ژنهای *GAS8* و *GAS8* Master Mix در این مطالعه از *ASI* پرداختیم. در این مطالعه از *Ampliqon* (کشور سازنده دانمارک) استفاده شد. دستگاه مورد استفاده در این مطالعه *Corbett (Rotor Gene 6000)* بود. ژن *HPRT1* به عنوان نرمالایز نیز انتخاب شد.

**طراحی پرایمر و پروب جهت واکنش**: برای طراحی پرایمر از نرم افزار *Allele ID* استفاده شد و جهت تایید عملکرد اختصاصی، توالی پرایمر طراحی شده با *BLAST* کردن در سایت *NCBI* بررسی شد. توالی پرایمرها در جدول ۲ نشان داده شده است.

**آنالیز داده های Real-Time PCR**: ارتباط میان بیان هر یک از ژن‌ها با فاکتورهای دموگرافیک با استفاده از *Package* ها و *Script* های زبان برنامه نویسی *R* و همچنین آنالیز نتایج *Real-Time PCR* با استفاده از آزمون آماری *Multilevel Bayesian* انجام شد. نتایجی که  $p < 0/05$  از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

**استخراج RNA**: در این مرحله استخراج RNA از نمونه های خون گرفته شده با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت *GeneAll* (کره ی جنوبی) و کلروفورم صورت گرفت.

**سنتز cDNA**: برای انجام PCR نیاز به DNA الگو می باشد و DNA پلی مرآز قادر به استفاده از RNA به عنوان الگو نمی باشد. بنابراین با سنتز DNA مکمل (*cDNA*) از RNA و سپس انجام RT-PCR تکثیر صورت می گیرد. به این منظور از کیت سنتز *cDNA* (*Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis* کشور سازنده آمریکا) استفاده شد. در مرحله اول روش RT-PCR از ملکول RNA به عنوان الگو برای سنتز مولکول *cDNA* استفاده می شود، بدین منظور یک آنزیم نسخه بردار معکوس ویروسی (*RT*) به همراه یک روش مناسب برای شروع واکنش پلی مریزاسیون مورد نیاز است. سپس در مرحله بعد با کمک PCR مولکول *cDNA* به طور لگاریتمی افزایش می یابد.

جدول ۱- مشخصات دموگرافیک دو گروه بیمار و کنترل

| متغیرها  | گروه بیماران MS | گروه کنترل    |
|--|-----------------|---------------|
| مرد/زن (تعداد به درصد)                             | ۳۵(۷۰)/۱۵(۳۰)   | ۳۵(۷۰)/۱۵(۳۰) |
| سن (mean ± SD, Y)                                  | ۳۶/۲ ± ۲/۷      | ۳۵/۳ ± ۲/۴    |
| سن (Median [Interquartile range], Y)               | ۳۹ [۴۵-۳۰]      | ۴۵ [۵۵-۱۳]    |
| Age of onset (mean ± SD, Y)                        | ۳۱/۴۱ ± ۲/۸     | -             |
| Disease duration (Median [Interquartile range], Y) | ۵ [۳-۱۰/۲۵]     | -             |
| EDSS score (mean ± SD)                             | ۳/۰۷ ± ۲/۵      | -             |

جدول ۲- پرایمرهای طراحی شده

| نام ژن       | توالی پرایمر و پروب               | طول پرایمر و پروب | طول محصول |
|--------------|-----------------------------------|-------------------|-----------|
| <i>HPRT1</i> | F: AGCCTAAGATGAGAGTTC             | ۱۸                | ۸۸        |
|              | R: CACAGAACTAGAACATTGATA          | ۲۱                |           |
|              | FAM-CATCTGGAGTCTATTGACATCGC-TAMRA | ۲۴                |           |



|     |    |                                     |          |
|-----|----|-------------------------------------|----------|
| ۱۲۱ | ۲۲ | F: CTACAACGACATCACCCCTCAAC          | GAS8     |
|     | ۲۰ | R: GTTCTGCCCAGACACCTCTG             |          |
|     | ۲۴ | FAM- TCTCCCTCTCCAGGTGGTCCTCCT-AMRA  |          |
| ۱۴۴ | ۲۰ | F: CCCATAGCCTGCCCCGTAAG             | GAS8-ASI |
|     | ۲۰ | R: CGTTGTCCCAGCATGTGAGC             |          |
|     | ۲۴ | FAM -CCCGTCTCCCTGTCCGCTTCCCAT-TAMRA |          |

## نتایج

**نتایج استخراج RNA:** استخراج RNA از نمونه‌های بیمار و سالم انجام گردید که در نتیجه‌ی آن غلظت و خلوص آن به وسیله دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌ها را بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر (TBE) 0.5X الکتروفورز شد. غلظت RNA در حدود ۲۵۰ میکروگرم بر میلی-لیتر و ۲۶۰/۲۸۰ OD بین ۱/۸ تا ۲ بوده که نشان-دهنده‌ی کیفیت مطلوب RNA بوده است. جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده بر روس ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. (شکل ۱).

**تعیین کیفیت cDNA:** برای تعیین کیفیت و صحت cDNA ساخته شده، طول محصول ژن *HPRT1* بر روی آگارز ۲ درصد نشان می‌دهد.

**تکثیر ژن *HPRT1*:** واکنش به صورت دوپلیکیت (duplicate) بر روی نمونه‌های نرمال و بیمار انجام شد. CT نمونه‌های فوق ۱۶/۵ و ۱۷ می‌باشد و کارایی انجام کار برای نمونه‌های فوق ۱/۸۱ و ۱/۷۶ می‌باشد.

**نتایج واکنش Real-time RT-PCR:** واکنش Real-time RT-PCR با استفاده از cDNA سنتز شده از نمونه‌های نرمال و بیمار برای ژن‌های *GAS8-ASI* و *GAS8* انجام شد.

**نتایج ژن *GAS8*:** به طور کلی ژن *GAS8* در بیماران به میزان ۴/۱۰۵ افزایش بیان داشته است، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری از نظر بیان ژن در دو گروه بیمار و سالم مشاهده می‌گردد، به طوری‌که با کنترل

اثرات سن و جنسیت، بطور متوسط نسبت بیان ژن در گروه بیمار ۴/۱ واحد بیشتر از گروه سالم برآورد گردید. که پس از تعیین ارزش ( $p = ۰/۰۰۱$ ) مشخص شد که معنی‌دار می‌باشد. با کنترل اثرات جنسیت و سن، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین نسبت بیان ژن دو گروه بیمار و کنترل مشاهده گردید ( $p = ۰/۰۱۱$ )، ارتباط بین بیان ژن با سن و جنس از نظر آماری معنی‌دار نبود. در جدول ۳ تمامی اطلاعات مربوط به ژن *GAS8* آورده شده است.

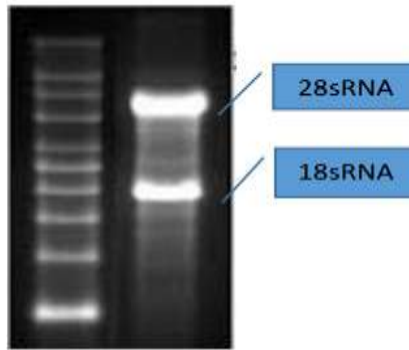
**نتایج ژن *GAS8-ASI*:** به طور کلی ژن *GAS8-ASI* در بیماران به میزان ۳/۰۸۴ افزایش بیان داشته است، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری از نظر بیان ژن در دو گروه بیمار و سالم مشاهده می‌گردد، به طوری‌که با کنترل اثرات سن و جنسیت، بطور متوسط نسبت بیان ژن در گروه بیمار ۳/۱ واحد بیشتر از گروه سالم برآورد گردید که پس از تعیین ارزش  $p < ۰/۰۰۱$  مشخص شد که معنی‌دار می‌باشد. در جدول ۴ تمامی اطلاعات مربوط به ژن *GAS8-ASI* آورده شده است. شکل‌های ۲ و ۳ نشان‌دهنده‌ی بیان نسبی *GAS8* و *GAS8-ASI* در گروه بیماران ام اس و افراد سالم می‌باشد.

**ارزیابی قدرت تشخیصی ژن‌ها و منحنی ویژگی عامل گیرنده:** بر اساس ارزش AUC، ژن *GAS8-ASI* دارای دقت ۹۹/۶ درصد برای تشخیص بیماران مرد مبتلا به ام اس را دارا می‌باشد. (شکل ۴). با این وجود



قدرت تشخیص این ژن در تمام بیماران کمتر بود  
 (AUC = ۰/۷۴۶، حساسیت = ۰/۹۲، اختصاصیت = ۰/۷۵۷)  
 بیشتر از بیماران مرد بود (AUC = ۰/۵۳۳، حساسیت = ۰/۷۳/۳، اختصاصیت = ۰/۸۰) (شکل ۴).

قدرت تشخیص این ژن در تمام بیماران کمتر بود  
 (AUC = ۰/۷۴۶، حساسیت = ۰/۹۲، اختصاصیت = ۰/۷۵۷)



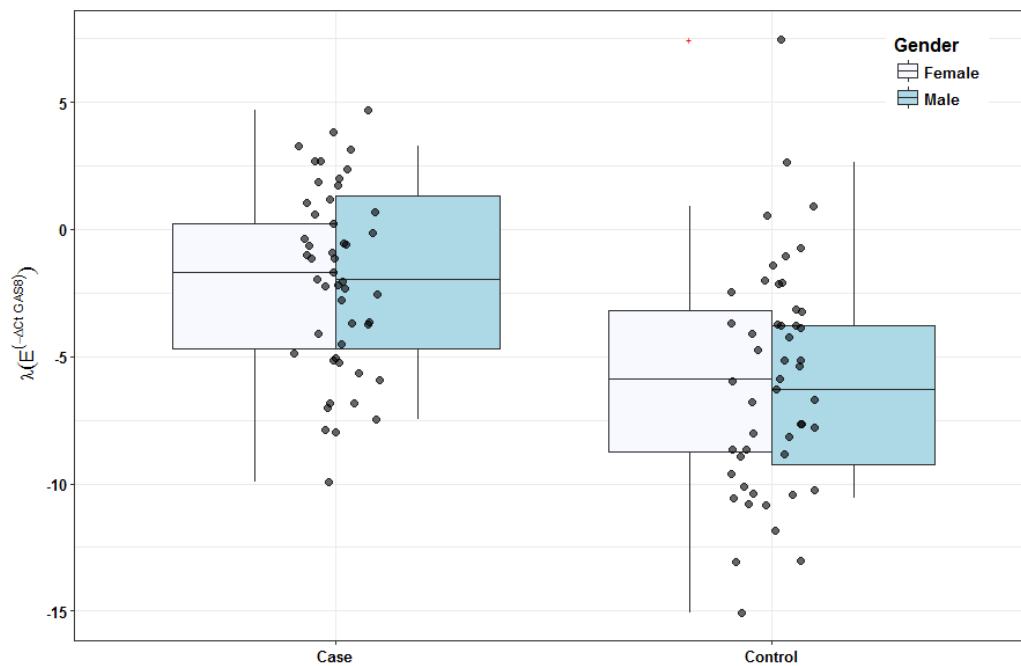
شکل ۱- RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد. باندهای 28S و 18S نشان‌دهنده کیفیت RNA استخراج شده

جدول ۳- جدول اطلاعات مربوط به بیان ژن GAS8

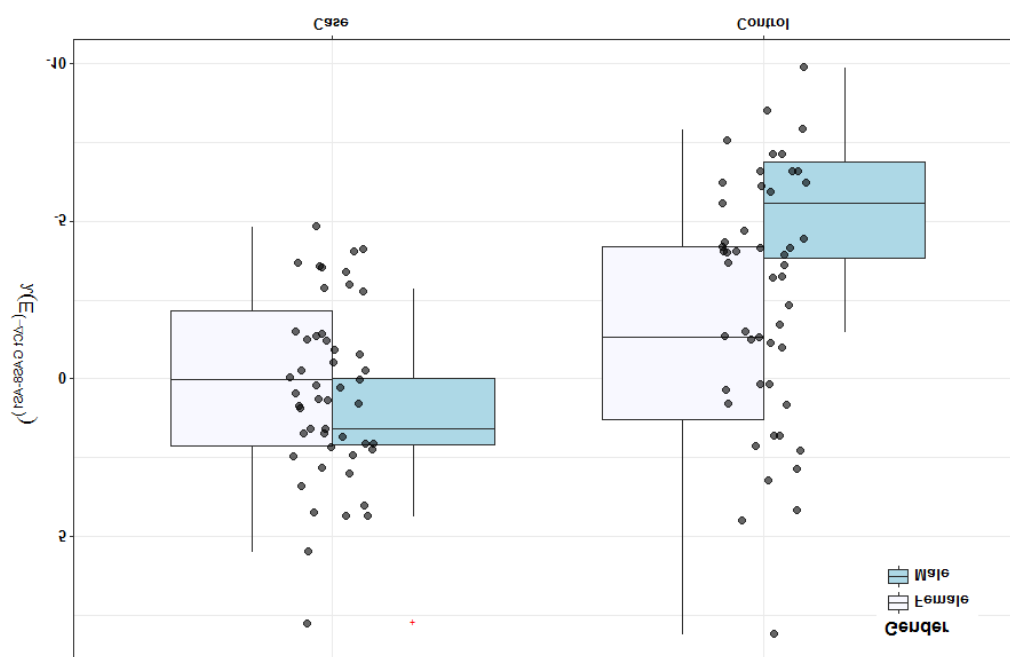
| 95% Crl for RE dif | p     | خطای معیار | Posterior RE dif <sup>pt</sup> | تعداد بیماران | تعداد کنترل | بیان GAS8 |
|--------------------|-------|------------|--------------------------------|---------------|-------------|-----------|
| [۲/۴۶، ۵/۸۳]       | ۰/۰۰۱ | ۰/۸۷       | ۴/۱۰۵                          | ۵۰            | ۵۰          | تعداد کل  |
| [۰/۵۸، ۸/۷۵]       | ۰/۱۸۱ | ۲/۰۹       | ۴/۷۳۹                          | ۱۵            | ۱۵          | مرد       |
| [۱/۹۶، ۵/۷۶]       | ۰/۰۰۲ | ۰/۹۷       | ۳/۷۶۱                          | ۳۵            | ۳۵          | زن        |
| [-۰/۸۴، ۸/۳۴]      | ۰/۰۷۵ | ۲/۳        | ۳/۷۹۵                          | ۱۳            | ۵           | مرد ≤ ۵۰  |
| [۲/۱۹، ۶/۸]        | ۰/۰۰۶ | ۱/۱۶       | ۴/۵۰۶                          | ۳۰            | ۲۷          | زن        |
| [-۳/۹، ۱۲/۰۳]      | ۰/۲۷۳ | ۳/۹۱       | ۴/۲۲۳                          | ۲             | ۱۰          | مرد < ۵۰  |
| [-۴/۳۳، ۵/۷۴]      | ۰/۹۳۲ | ۲/۴۹       | ۰/۷۹۱                          | ۵             | ۸           | زن        |

جدول ۴- جدول اطلاعات مربوط به بیان ژن GAS8-ASI

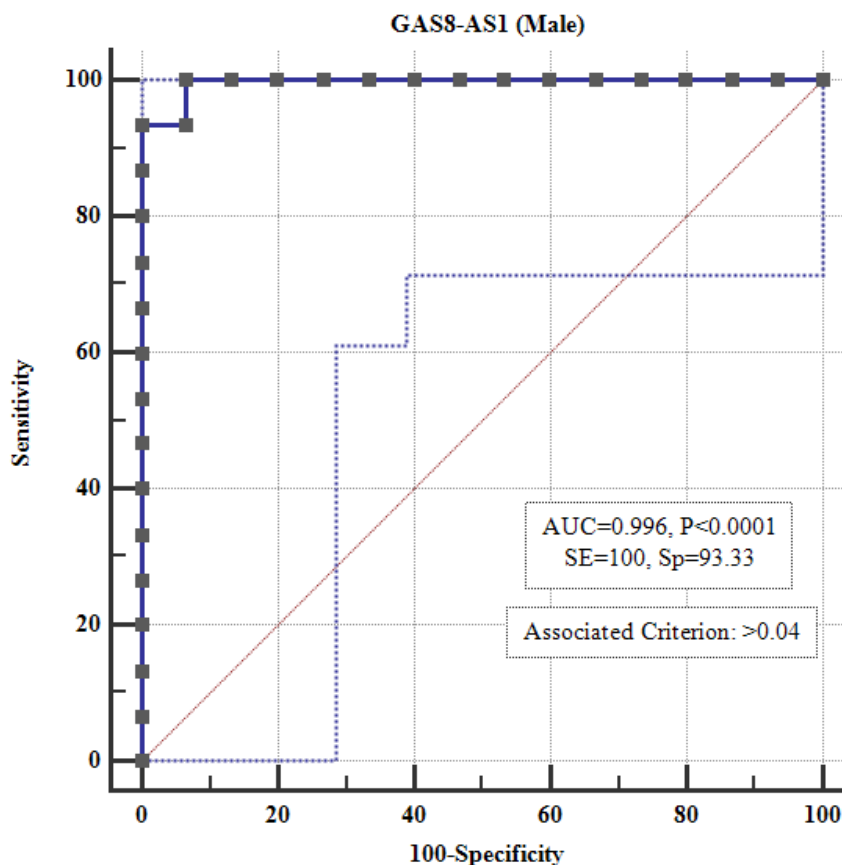
| 95% Crl for RE dif | p       | خطای معیار | Posterior RE dif | تعداد بیماران | تعداد کنترل | بیان GAS8-ASI |
|--------------------|---------|------------|------------------|---------------|-------------|---------------|
| [۱/۷۱، ۴/۴۶]       | <۰/۰۰۰۱ | ۰/۷۱       | ۳/۰۸۴            | ۵۰            | ۵۰          | تعداد کل      |
| [۵/۵۴، ۱۰/۳۳]      | <۰/۰۰۰۱ | ۱/۲۴       | ۷/۸۸۳            | ۱۵            | ۱۵          | مرد           |
| [-۰/۱۷، ۳/۱۲]      | ۰/۳۰۴   | ۰/۸۴       | ۱/۴۹۵            | ۳۵            | ۳۵          | زن            |
| [۳۲/۸۷، ۱۰/۴]      | <۰/۰۰۰۱ | ۱/۶۸       | ۷/۲۰۷            | ۱۳            | ۱۳          | ۵ ≤ ۵۰        |
| [۰/۰۳، ۳/۲۶]       | ۰/۳۳۹   | ۰/۸۶       | ۱/۵۹۵            | ۳۰            | ۳۰          | ۲۷            |
| [۳/۷۹، ۱۰/۶]       | <۰/۰۰۰۱ | ۱/۷۳       | ۷/۲۱             | ۲             | ۲           | ۱۰ ≥ ۵۰       |
| [-۵/۴۸، ۷/۸۱]      | ۰/۶۸    | ۳/۳۵       | ۱/۲۲۴            | ۵             | ۵           | ۸             |



شکل ۲- بیان نسبی GAS8 در گروه بیماران ام اس و افراد سالم



شکل ۳- بیان نسبی GAS8-AS1 در گروه بیماران ام اس و افراد سالم



شکل ۴- آنالیز منحنی ROC برای ارزیابی قدرت تشخیصی GAS8-AS1 در مردان مبتلا به MS

### بحث

در رابطه با بیان نسبی ژن‌های GAS8 و GAS8-AS1 افزایش بیان بالایی را در مقایسه با گروه کنترل در بیماران MS مشاهده کردیم. ارتباط بین پروتئین GAS8 و دستگاه گلژی و برهم کنش فیزیکی بین رسبورهایی مانند Toll و این دستگاه سلولی ممکن است یک ارتباط عملکردی بین ام اس و پاتوژن آن مهیا سازد (۱۱). الگوی بیان جنسیتی در هر دو ژن را به گونه‌ای یافتیم که تفاوت در بیان GAS8 در زنان بیمار معنی دار بود، در حالی که اختلاف بیان GAS8-AS1 در بیماران مذکر در مقایسه با افراد سالم مورد بررسی معنی دار بود. آنالیزهای پیشین بیان ژن کل ژنوم نیز در بیماران فاز RRMS مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی را در زنان و مردان نشان داده است. این

بیماری MS به عنوان یک اختلال دمیلینه‌کننده‌ی سیستم اعصاب مرکزی با تغییر چندین مولکول و مسیرهای سیگنالینگ در خون و سیستم اعصاب مرکزی در نظر گرفته می‌شود (۳). بیماری MS دارای یک دوره پاتولوژیک ابتدایی، فاز عود کننده-بهبود یابنده و ثانویه است که به تدریج باعث نقص سیستم عصبی مرکزی می‌شود. ام اس یک بیماری مولتی فاکتوریال می‌باشد، بدین مفهوم که علل ژنتیکی و محیطی مختلفی، در القای بیماری دخیل می‌باشند. به طور گسترده، این نظریه مورد قبول است که ام اس، یک اختلال دمیلینه کننده است که سیستم ایمنی به میلین حمله کرده و سبب نورودنراسیون می‌شود (۷).





### نتیجه‌گیری

بیان نسبی هر دو ژن GAS8 و GAS8-AS1 در گروه بیماران در مقایسه با افراد سالم افزایش چشم‌گیری داشته است. همچنین، بر اساس آنالیزهای منحنی عامل گیرنده ژن GAS8-AS1 در گروه مردان دارای قدرت تشخیص بیماری معرفی گردید. علاوه بر این در نتایج، الگوی بیان ژن‌ها بر اساس جنسیت را نیز مشاهده کردیم. بر خلاف مطالعات پیشین همبستگی ای بین ژن‌ها مشاهده نشد.

### تشکر و قدردانی

از بیماران مالتیپل اسکلروزیس شهر همدان که با رضایت در مطالعه شرکت کردند قدردانی می‌کنیم.

### منابع

1. Achiron A., Feldman A., Mandel M., Gurevich M. 2007. Impaired Expression of Peripheral Blood Apoptotic-Related Gene Transcripts in Acute Multiple Sclerosis Relapse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1107(1): 155-167.
2. Colantonio J.R., Vermot J., Wu D., Langenbacher A.D., Fraser S., Chen J.N. 2009. The dynein regulatory complex is required for ciliary motility and otolith biogenesis in the inner ear. *Nature*, 457(7226): 205-102.
3. Gironi M., Bergami A., Brambilla E., 2016. Immunological markers in multiple sclerosis. *Neurological Sciences*, 21(2): S871
4. Imamura K., Akimitsu N. 2014. Long non-coding RNAs involved in immune responses. *Frontiers in Immunology*, 5: 573.
5. Kurtzke J.F. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology*, 33: 1444-1452.
6. Lazarou M., Narendra D.P., Jin S.M., Tekle E., Banerjee S., Youle R.J. 2013.

آنالیزها مشارکت ویژه ای بر اساس جنسیت بیماران در RNA های غیرکدکننده گزارش داده‌اند (۶).

یافته‌های ما همراه با ارزیابی‌های بیانی به روش high throughput بر روی این موضوع که جنسیت بر فعالیت، دامنه و نقص پاسخ‌های ایمنی اثرگذار می‌باشد تاکید می‌کند. این واقعیت که زنان نسبت به مردان باعث القای بیشتر ایمنی ذاتی و اکتسابی می‌شوند (۱۰) ممکن است در برهمکنش بین بیان GAS8-AS1 و جنسیت در این مطالعه نشان داده شود. هم بستگی معکوس معناداری بین بیان ژن‌های ذکر شده و سن بیماران مورد مطالعه در مردان مبتلا پیدا شد. عدم وجود همبستگی بین بیان GAS8 و GAS8-AS1 و سن در افراد مونث، از یک سو از تنظیمات جنسیتی این ژن‌ها پشتیبانی می‌کند و از سوی دیگر این ژن‌ها را به عنوان نشانگرهای مستقل سن برای ام اس در افراد مونث معرفی می‌کند. به رغم نقش مورد انتظار GAS8-AS1 در تنظیم بیان GAS8، ما هیچ ارتباط معنی داری بین بیان این ژن‌ها در خون محیطی بیماران یا افراد سالم نداشتیم که ممکن است مستلزم سازوکارهای نظارتی مستقل برای بیان آنها باشد. در نهایت، قدرت تشخیصی GAS8 و GAS8-AS1 را در تمام زیر گروه بیماران و افراد سالم مورد بررسی قرار دادیم و بالاترین عملکرد را برای سطوح رونویسی GAS8-AS1 در تشخیص وضعیت بیماری در افراد مرد یافتیم. همانطور که انتظار می‌رود از تجزیه و تحلیل بیان، سطوح رونویسی GAS8 در تمایز وضعیت بیماری در افراد زن در مقایسه با بیماران مردانه موثر بود.

اگر چه نتایج ما نشان می‌دهد که سرخ‌های اولیه برای طراحی پنل‌های بیومارکرخاص جنس برای ام اس یافته‌ایم اما بر اساس تعداد کم نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه، این داده‌ها باید با احتیاط تفسیر شود.



11. van Kester M.S., Borg M. K., Zoutman W.H., Out-Luiting J.J., Jansen P.M., Dreef, E.J., Vermeer M.H., van Doorn R., Willemze R., Tensen C.P. 2012. A Meta-Analysis of Gene Expression Data Identifies a Molecular Signature Characteristic for Tumor-Stage Mycosis Fungoides, *Journal of Investigative Dermatology*, 132(8):2050-2059.
12. Whitmore S.A., Settasatian C., Crawford J., Lower K.M., McCallum B., Seshadri R. 1998. Characterization and Screening for Mutations of the Growth Arrest-Specific 11 (GAS11) and C16orf3 Genes at 16q24.3 in Breast Cancer. *Genomics*, 52(3): 325-331.
13. Zozulya A.L., Wiendl H. 2008. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nature Reviews of Neurology*, 4(7): 384.
- PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *Journal of Cell Biology*, 200(2): 163-172.
7. Milo R., Kahana E. 2010. Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity Reviews*, 9(5): A387-A94.
8. Qin Y., Sun W., Zhang H., Zhang P., Wang Z., Dong W. 2018. LncRNA GAS8-AS1 inhibits cell proliferation through ATG5-mediated autophagy in papillary thyroid cancer. *Endocrine*, 59(3):555-64.
9. Satoh J.I., Nakanishi M., Koike F., Miyake S., Yamamoto T., Kawai M. 2005. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 18(3): 537-550
10. Solomon A.J., Klein E.P., Bourdette D. 2012. "Undiagnosing" multiple sclerosis: the challenge of misdiagnosis in MS. *Neurology*, 78(24):1986-1991.