

بررسی همراهی پلی مورفیسم‌های rs7975232 و rs731236 ژن VDR با MS در جمعیت استان خوزستان

شادی قائمی^۱، محمد شفيعی^{۲*}، حمید گله‌داری^۳، مهدی پورمهدی بروجنی^۴

چکیده

زمینه و هدف: بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خودایمن، دمیلینه کننده و تخریب کننده سیستم اعصاب مرکزی است. MS بر اثر برهمکنش عوامل محیطی و ژنتیکی رخ می‌دهد. در دهه‌ی گذشته توجه بسیار زیادی به ویتامین D و نقش آن در MS شده است. داده‌های اخیر نشان می‌دهد که ویتامین D ریسک ابتلا و سیر بالینی بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهد. ویتامین D از طریق رسپتور ویتامین D (VDR) عمل می‌کند. در این مطالعه نقش پلی مورفیسم‌های rs7975232 و rs731236 از ژن VDR در ایجاد MS در جمعیت استان خوزستان بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه ۱۵۰ فرد بیمار با ۱۵۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل مقایسه گردیدند. برای تمام نمونه‌ها، سطح سرمی ویتامین D اندازه گیری شد و پلی مورفیسم‌های rs7975232 و rs731236 از ژن VDR توسط روش PCR و سپس RFLP مطالعه و با توالی یابی مستقیم تایید شد. سپس نتایج با روشهای آماری آنالیز گردید.

یافته‌ها: اختلاف معناداری در سطح سرمی ویتامین D بین بیماران و افراد سالم مشاهده نگردید. در بررسی rs731236 با مینا قرار دادن ژنوتیپ AG، مقدار OR برای ژنوتیپ-های AA و GG به ترتیب برابر با ۱/۲ ($P=0/46$) و ۱/۵۱ ($P=0/33$) بدست آمد. برای rs7975232 با مینا قرار دادن ژنوتیپ CC، مقدار OR برای ژنوتیپ‌های CA و AA به ترتیب برابر با ۸/۶۵ ($P<0/001$) و ۵/۶ ($P<0/001$) بدست آمد.

نتیجه گیری: بنابراین پلی مورفیسم rs7975232 از ژن VDR در ارتباط با بیماری MS بوده و با آن همراهی خوبی نشان می‌دهد، اما پلی مورفیسم rs731236 با این بیماری همراهی نشان نمی‌دهد.

واژه‌های کلیدی: مطالعات همراهی، مولتیپل اسکلروزیس، ژن VDR، پلی مورفیسم‌های rs7975232 و rs731236

۱- کارشناس ارشد ژنتیک.

۲- استادیار بیوشیمی.

۳- استاد ژنتیک مولکولی.

۴- دانشیار اپیدمیولوژی.

۱ و ۲- گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

* نویسنده مسؤول:

محمد شفيعی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۱۷۱۱۳۱۹

Email: m.shafiei@scu.ac.ir

مقدمه

CYP27A1 به 25-hydroxyvitamin D3 متابولیزه می‌شود. متابولیت 25-hydroxyvitamin D3 توسط CYP27B1 کلیوی به 1,25-hydroxyvitaminD3 یا همان کلسیتریول (1,25(OH)2D; calcitriol) که فعال ترین متابولیت ویتامین D است تبدیل می‌شود. داده ها نشان می‌دهند که فرم فعال ویتامین D در عملکردهای مغزی درگیر می‌شود به همین جهت گیرنده‌های این ویتامین در نورون‌ها و سلول‌های گلیال متمرکز شده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که افراد مبتلا به MS سطح سرمی پایینی از ویتامین D دارند و این وضعیت با افزایش نرخ شکستگی استخوان در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم آشکار می‌شود (۵). در یک مدل حیوانی مبتلا به MS مهار دوره ی بیماری پس از تزریق فرم فعال بیولوژیک ویتامین D مشاهده شد (۶,۵) زیرا حضور ویتامین D منجر به کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی و اینترفرون گاما می‌شود. این در حالی است که $INF\gamma$ به مقدار بسیار زیادی در سرم، پلاسما و ضایعات افراد مبتلا به MS وجود دارد. در مدل‌های آزمایشگاهی نشان داده شده که ویتامین D نقش تعیین کننده‌ای در تنظیم سیستم ایمنی بدن دارد. در نتیجه کمبود این ویتامین منجر به نقص در سیستم ایمنی بدن می‌گردد و فرصت عفونت‌های باکتریایی و ویروسی از جمله ویروس EBV (Epstein bar virus) که یک ریسک فاکتور قوی برای ابتلا به MS به حساب می‌آید فراهم می‌گردد زیرا آنتی‌ژن‌های ویروسی EBV که مورد هدف سیستم ایمنی قرار می‌گیرند دارای همولوژی ساختاری با آنتی‌ژن‌های خودی هستند و این همولوژی باعث القای خودایمنی در CNS می‌شود و تکثیر بیشتر ویروس منجر به افزایش پاسخ سیستم ایمنی و التهاب می‌گردد (۶,۱۰).

چندین مطالعه تاثیر ماه تولد بر روی ریسک ابتلا به بیماری MS را نشان داده‌اند. در شمال ساردینیا که یک منطقه با

بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) اولین بار توسط Jean Martin Charcot نورولوژیست فرانسوی در سال ۱۸۶۸ نام گذاری و توصیف شد (۱). بیماری MS یک بیماری مزمن التهابی است که طی آن غلاف میلین که دورتادور آکسون‌های مغز و نخاع را پوشانده است آسیب دیده و منجر به میلین زدایی و زخم می‌شود (۲). مشخصه‌ی بارز بیماری وجود پلاک‌هایی می باشد که در دستگاه عصبی مرکزی (Central nervous system) و به خصوص عصب بینایی، ساقه‌ی مغز و نخاع تجمع پیدا می کنند (۳). این بیماری معمولاً در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی خود را نشان می‌دهد و همانند سایر بیماری‌های خود ایمن زنان بیشتر از مردان به این بیماری مبتلا می شوند.

بر اساس پایگاه داده‌ی اطلس MS، در حدود ۲/۵ میلیون نفر در دنیا به این بیماری مبتلا هستند (۴). تفاوت قابل توجه در بروز MS و سایر بیماری‌های خودایمن به عنوان تابعی از عرض جغرافیایی نشان می دهد که وضعیت ویتامین D در بدن یک ریسک فاکتور تعیین کننده در ابتلا به بیماری است. در حال حاضر شواهد برای نقش حفاظتی ویتامین D در بروز MS به اندازه ای قوی است که مکمل های ویتامین D برای افراد مبتلا به MS و افرادی که در معرض خطر بالا برای ابتلا به این بیماری هستند در نظر گرفته می‌شود. در انسان‌ها کوله کلسیفرول (Cholecalciferol) (ویتامین D3) پس از برخورد اشعه‌ی ماورای بنفش B به 7-dehydrocholesteol در پوست تولید می‌شود. ویتامین D3 در بدن از رژیم غذایی نیز به دست می آید. هردو ویتامین D که به صورت سنتزی یا خوراکی وارد بدن می شود در نهایت به کبد منتقل شده و به پروتئین متصل شونده به ویتامین D (vitamin D binding protein VDBP) اتصال می یابد. ویتامین D توسط سایتوکروم‌های کبدی P450 و CYP2R1 و

پروتئین VDR دارای دومین‌های مختلفی است. دومین A/B که در پایانه‌ی آمینو گیرنده قرار دارد یک منطقه‌ی به شدت متغیر (hyper-variable region) است. اگرچه نقش دقیق این دومین مشخص نیست اما تنوع آن بین گیرنده‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً باید برای انتخاب هورمون و گیرنده مهم باشد. دومین C یا دومین متصل شونده به DNA یک دومین به شدت حفظ شده در بین گیرنده‌های هسته‌ای است و شامل ۹ سیستئین است. هشت سیستئین اول به دو اتم روی متصل می‌شوند و موتیف متصل شونده به DNA را به وجود می‌آورند. دومین D بین دومین متصل شونده به DNA و دومین متصل شونده به لیگاند قرار دارد و ناحیه‌ی لولا (hinge region) نامیده می‌شود. این دومین به شدت انعطاف‌پذیر است و با ایجاد آزادی چرخش اجازه‌ی اتصال رسپتور به عناصر پاسخ دهنده را می‌دهد. دومین E/F یا دومین اتصال به لیگاند چند عملکردی (multifunctional ligand-binding domain (LBD)) می‌باشد که علاوه بر اتصال به هورمون، LBD به RXR نیز متصل می‌شود و به این ترتیب نقش کلیدی در هتروداایمریزاسیون ایفا می‌کند. باقی‌مانده‌های سرین در این دومین، مکان‌هایی برای فسفوریلاسیون VDR هستند که ممکن است در تنظیم فعالیت رونویسی نقش داشته باشند. این ناحیه در اتصال‌های پروتئین-پروتئین مانند اتصال VDR به TFIIIB که فاکتور دخیل در فعال‌سازی DNA پلی‌مراز II است نیز نقش دارد. LBD دارای یک منطقه‌ی به شدت حفظ شده به نام AF-2 می‌باشد که برای فعالیت رونویسی بسیار ضروری است. جهش‌ها در این منطقه منجر به اختلال در فرایند رونویسی میشوند بدون اینکه تاثیری بر سایر فعالیت‌های رسپتور داشته باشند. AF-2 در سمت کربوکسیل VDR قرار دارد و شامل اسیدآمینه‌های ۴۱۶ تا ۴۲۳ می‌باشد (۱۴).

شیوع MS بالاست نشان داده شد که بیشتر افراد مبتلا به MS متولد فصل بهار می‌باشند (۷). داده‌های حاصل از مطالعات ماه تولد افراد مبتلا به MS در کانادا، دانمارک، بریتانیا و سوئد نشان می‌دهد که بیشتر افراد مبتلا متولد ماه اردیبهشت هستند و فقط تعداد کمی از آن‌ها متولد ماه آبان می‌باشند (۸). قرار گرفتن در معرض نور خورشید طی دوران کودکی به میزان قابل توجهی ریسک ابتلا به MS را کاهش می‌دهد. به عنوان مثال در تاسمانی استرالیا افرادی که در سن ۶ تا ۱۵ سالگی به میزان بیشتری در معرض نور خورشید قرار داشته‌اند کاهش قابل توجه ریسک ابتلا به MS را نشان داده‌اند (۶). در بعضی از مطالعات دیده شده که مهاجرت از مناطق کم‌خطر به مناطق پرخطر در اوایل زندگی خطر ابتلا به این بیماری را زیاد می‌کند. توجیه احتمالی این افزایش شانس ابتلا، می‌تواند نشان دهنده‌ی تاثیر عرض جغرافیایی و نقش حفاظتی ویتامین D باشد (۹). ویتامین D تاثیر خود را با استفاده از رسپتور ویتامین D (VDR) اعمال می‌کند. VDR پلی‌پپتیدی درون سلولی است و جزء گیرنده‌های درون هسته‌ای می‌باشد که متعلق به ابرخانواده‌ی گیرنده‌های هورمون‌های استروئیدی-تیروئیدی می‌باشد. هر VDR پس از متصل شدن به کلسیتریول به شکل همودایمر VDR/VDR یا هتروداایمر VDR/RXR (Retinoid X receptor) به عناصر پاسخ دهنده به ویتامین D موجود در DNA سلول هدف متصل می‌شود و RNA ویژه‌ای را کد می‌کند که در نتیجه‌ی آن پروتئینی تولید می‌شود که می‌تواند برخی از فعال‌کننده‌ها و سرکوب‌کننده‌های رونویسی ژن را فعال کند. همچنین VDR پس از دایمر شدن میل بسیار بالایی برای اتصال به VDRE‌ها دارد و بسته به اینکه با چه پروتئین‌هایی همراه شود می‌تواند توسط بازآرایی کروماتین به وسیله استیلاسیون و داستیلاسیون، منجر به فعال‌سازی یا سرکوب رونویسی برخی از ژن‌ها گردد (۵، ۱۱، ۱۲، ۱۳).

روش بررسی

نوع مقاله: تحقیقاتی-پژوهشی اصیل

۲,۱. جمعیت مورد مطالعه. در این مطالعه ۱۵۰ فرد مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس که توسط پزشک متخصص و بر اساس معیار تشخیص McDonald مورد تایید قرار گرفته و همچنین ۱۵۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل از استان خوزستان مورد بررسی قرار گرفت. گروه کنترل و بیمار هیچگونه مکمل ویتامین D را مصرف نمی‌کردند. نمونه‌گیری خون بیماران در انجمن MS خوزستان و با رضایت کامل بیماران انجام شد. نمونه‌گیری گروه کنترل در بیمارستان شفا و با رضایت کامل صورت گردید. گروه کنترل بدون سابقه‌ی بیماری خودایمن بوده و از نظر سن و جنس با گروه بیمار مطابقت داشتند. سطح سرمی ویتامین D در هر دو گروه به روش الیزا با استفاده از کیت اندازه‌گیری شد. در این مطالعه سطح سرمی ویتامین D در چهار سطح به ترتیب زیر طبقه بندی گردید: کمبود شدید ۱۰-۰ نانوگرم بر میلی لیتر، کمبود متوسط ۲۰-۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر، کمبود خفیف ۳۰-۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر و نرمال ۳۰/۱ نانوگرم بر میلی لیتر و بیشتر (۱۸).

۲,۲. تعیین ژنوتیپ در محل پلی مورفیسم. استخراج DNA از نمونه خون گروه بیماران و گروه کنترل با استفاده از روش salting out صورت گردید. در مرحله بعد نوع پلی مورفیسم‌های rs731236 و rs7975232 با استفاده از PCR-RFLP مشخص گردید. به این صورت که ابتدا بخشی از ژن VDR که حاوی هر دو پلی مورفیسم می‌باشد توسط روش PCR و با استفاده از پرایمرهای رفت (-5'

GGTATCACCGGTCAGCAGTCATAG-3')

و برگشت (-5'

ACAAGGGGCGTTAGCTTCATGC-3')

زمانبندی جدول ۱ و دمای Tm ۶۰ درجه‌ی سانتیگراد

ژن VDR بیش از ۱۰۰ کیلو باز طول دارد. ژن VDR روی کروموزوم ۱۲ در جایگاه q12-14 واقع است و شامل ۹ اگزون و ۸ اینترون می‌باشد که اگزون‌های غیرکدشونده‌ی 1A و 1B و 1C در بخش ۵" ژن قرار دارند و اگزون‌های ۲ تا ۹ ساختمان پروتئین VDR را رمز می‌کنند.

پلی مورفیسم‌های ژن VDR در ارتباط با ابتلا به چندین بیماری خودایمن از جمله MS می‌باشند. واریانت‌های خاصی از ژن VDR ممکن است عملکرد و متابولیسم ویتامین D را تغییر دهند (۵,۱۱,۱۲). پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs731236A/G بر روی اگزون شماره‌ی ۹ (در دومین اتصال به لیگاند چند عملکردی پروتئین این ژن) قرار دارد و یک جهش هم‌معنی آمینواسید ۳۵۲ یعنی ایزولوسین می‌باشد. ولی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs7975232C/A در اینترون بین اگزون‌های ۸ و ۹ ژن VDR قرار دارد.

اگرچه این پلی مورفیسم‌ها تغییری در ساختار پروتئین ایجاد نمی‌کنند اما نزدیکی آن‌ها به ناحیه‌ی 3'UTR ژن ممکن است فرآیند اتصال mRNA به کمپلکس ترجمه، روند تخریب mRNA یا مسیرهای سیگنالینگ را تحت تاثیر قرار دهد (۱۵,۵). در یک مطالعه نشان داده شد که در پلی مورفیسم rs731236 A/G بیان ژن با آلل G به میزان ۳۰٪ کمتر از بیان ژن با آلل A می‌باشد (۵).

مطالعات مختلفی که تاکنون بر روی همراهی این پلی مورفیسم‌ها با بیماری MS صورت گرفته نتایج متفاوتی را در مورد نقش آنها در ایجاد این بیماری ارائه کرده اند (۱۶, ۱۷, ۵). با استفاده از این یافته‌های ژنتیکی و باتوجه به نقش احتمالی VDR در MS ما به دنبال بررسی رابطه‌ی بین ژن VDR در دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs731236 و rs7975232 و استعداد ابتلا به MS در جمعیت استان خوزستان می‌باشیم.

و Apai بر اساس نوع ژنوتیپ پلی مورفیسم مطابق جدول ۲ بوده و بر روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲).

در پلی مورفیسم rs731236 فراوانی ژنوتیپی به تفکیک قومیت و جنسیت محاسبه شد که اختلاف معناداری بین ژنوتیپ‌ها در افراد بیمار و کنترل مشاهده نگردید. در یک مقایسه کلی بین فراوانی ژنوتیپی دو گروه بیمار و کنترل، صرف نظر از جنسیت و قومیت، نتایج به صورت زیر می‌باشد که اختلاف معناداری را نشان ندادند ($P > 0.05$).

$X^2 = 1/19$, $df = 2$, $P\text{-value} = 0.955$

برای پلی مورفیسم rs7975232 فراوانی ژنوتیپی به تفکیک قومیت و جنسیت محاسبه شد که اختلاف معناداری بین ژنوتیپ‌ها در افراد بیمار و کنترل مشاهده نگردید. در یک مقایسه کلی بین فراوانی ژنوتیپی دو گروه بیمار و کنترل، صرف نظر از جنسیت و قومیت، نتایج به صورت زیر می‌باشد که اختلاف معناداری را نشان می‌دهد ($P < 0.001$).

$X^2 = 43/64$, $df = 2$, $P\text{-value} < 0.001$

با استفاده از رگرسیون لجستیک، P-value هر ژنوتیپ بطور مستقل نیز سنجیده شد و خلاصه‌ای از نتایج حاصل شده برای فراوانی ژنوتیپی و آلی دو گروه بیمار و کنترل برای هر دو پلی مورفیسم در جداول ۳ و ۴ ارائه گردیده است.

تکثیر گردید. سپس با استفاده از آنزیم‌های TaqI و Apai، SNP‌های مربوطه برش داده شد و بر روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده شد.

۲،۳. آنالیز آماری. برای آنالیز آماری داده‌های حاصل، از برنامه‌ی آماری SSPS استفاده گردید. نتایج به دست آمده با به کارگیری روش‌های آماری Chi-square (χ^2) و رگرسیون لجستیک و با در نظر گرفتن مقدار p-value کوچکتر از ۰/۰۵ به عنوان معنادار بودن اختلاف، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

۱۵۰ بیمار شامل ۱۰۸ زن و ۴۲ مرد بودند و گروه کنترل نیز شامل ۹۴ زن و ۵۶ مرد بودند. برای به حداقل رساندن تاثیر این مساله که ممکن است افراد گروه کنترل در آینده به بیماری MS مبتلا گردند فقط افراد بالای ۴۰ سال به عنوان گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفتند. سن افراد بیمار نیز بین ۲۲ تا ۵۲ سال بود. میانگین سطح سرمی ویتامین D در افراد بیمار ۲۰/۷۶ نانوگرم بر میلی لیتر و در افراد کنترل سالم ۲۲/۳۵ نانوگرم بر میلی لیتر بدست آمد که از لحاظ آماری دارای اختلاف معناداری نمی‌باشند ($P = 0.55$). نوع پلی مورفیسم‌های rs731236 و rs7975232 از ژن VDR با استفاده از PCR-RFLP مشخص گردید. قطعات مورد انتظار حاصل از برش توسط آنزیم‌های TaqI

جدول ۱: برنامه حرارتی و زمانی PCR

Step	Temperature	Time	Cycle
Primary denaturation	95	5minutes	1
Secondary denaturation	95	30second	30
Annealing	60	30second	30
Elongation	72	45second	30
Final elongation	72	5minutes	1

جدول ۲: طول قطعات حاصل از RFLP در ژنوتیپ های مختلف

rs7975232 C>A			rs731236 A>G		
طول محصول PCR: ۳۷۲ جفت باز			طول محصول PCR: ۳۷۲ جفت باز		
ApaI			TaqI		
قطعات ایجاد شده در ژنوتیپ های مختلف (bp)			قطعات ایجاد شده در ژنوتیپ های مختلف (bp)		
CC	CA	AA	AA	AG	GG
۲۷۴	۳۷۲	۳۷۲	۳۷۲	۳۷۲	۱۹۸
۹۸	۲۷۴			۱۹۸	۱۷۴
	۹۸			۱۷۴	

جدول ۳: خلاصه ای از مقایسه نتایج حاصل از تعیین فراوانی ژنوتیپی و آلی دو گروه بیمار و کنترل پلی مورفیسم rs731236

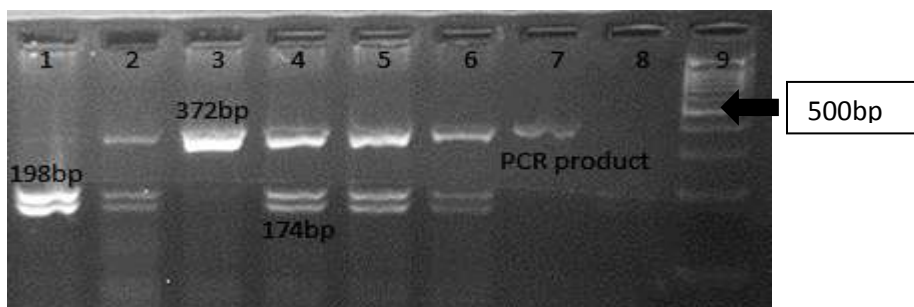
ژنوتیپ/الل	بیمار	کنترل	OR(95%CI)	P-value
AG	۵۹	۶۷	-	-
AA	۷۵	۷۱	۱/۲(۰/۷۴-۱/۹۳)	۰/۴۶
GG	۱۶	۱۲	۱/۵۱(۰/۶۶-۳/۴۶)	۰/۳۳
GG+AG	۷۵	۷۹	-	-
AA+AG	۱۳۴	۱۳۸	۱/۰۲(۰/۶۹-۱/۵۲)	۰/۹
A	۲۰۹	۲۰۹	۱(۰/۷۱-۱/۴۲)	۱
G	۹۱	۹۱	-	-

(ژنوتیپ هتروزیگوت AG به عنوان مبنا در نظر گرفته شده است.)

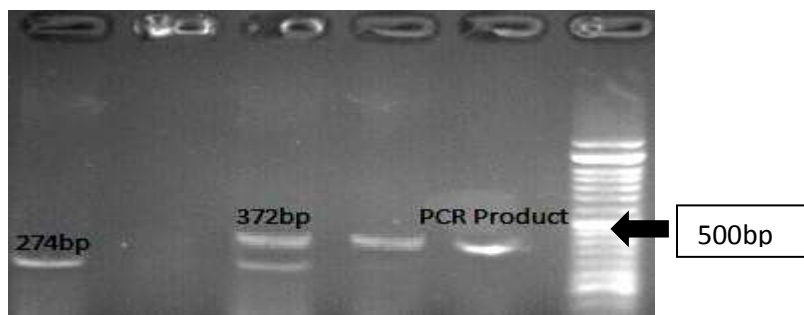
جدول ۴: خلاصه ای از مقایسه نتایج حاصل از تعیین فراوانی ژنوتیپی واللی دو گروه بیمار و کنترل برای پلی مورفیسم rs7975232

ژنوتیپ/الل	بیمار	کنترل	OR(95%CI)	P-value
CC	۴۲	۱۱۱	-	-
CA	۷۲	۲۲	۸/۶۵(۴/۷۷-۱۵/۶۸)	<۰/۰۰۱
AA	۳۶	۱۷	۵/۶(۲/۸۴-۱۱/۰۲)	<۰/۰۰۱
CC+CA	۱۱۴	۱۳۳	-	-
AA+CA	۱۰۸	۳۹	۳/۲۳(۲/۰۷-۵/۰۳)	<۰/۰۰۱
C	۱۵۶	۲۴۴	-	<۰/۰۰۱
A	۱۴۴	۵۶	۴/۰۲(۲/۷۸-۵/۸۱)	

(ژنوتیپ هموزیگوت CC به عنوان مبنا در نظر گرفته شده است.)



شکل ۱: ژل آگارز برای قطعات حاصل از RFLP در پلی مورفیسم rs731236. چاهک ۱ ژنوتیپ هموزیگوت GG، چاهک‌های ۲ و ۴ و ۵ و ۶ ژنوتیپ هتروزیگوت AG و چاهک ۳ ژنوتیپ هموزیگوت AA را نشان می‌دهد. چاهک ۷ محصول PCR و چاهک ۸ کنترل منفی PCR و چاهک ۹ مارکر را نشان می‌دهد.



شکل ۲: ژل آگارز برای قطعات حاصل از RFLP در پلی مورفیسم rs7975232. چاهک ۱ ژنوتیپ هموزیگوت CC، چاهک ۳ ژنوتیپ هتروزیگوت CA و چاهک ۴ ژنوتیپ هموزیگوت AA را نشان می‌دهد. چاهک ۵ محصول PCR و چاهک ۲ کنترل منفی را نشان می‌دهد. چاهک ۶ نیز مارکر را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه گیری

ویتامین D در دو گروه اختلاف معناداری نداشت. مطالعات مختلفی سطح سرمی ویتامین D را در بیماران و افراد سالم بررسی کرده‌اند. در بعضی از این مطالعات سطح سرمی ویتامین D در افراد مبتلا به MS کمتر از افراد سالم گزارش شده است (۲۰، ۲۱). از طرفی سایر مطالعات بخصوص مطالعات دیگری که در استان خوزستان صورت گرفته نتایج مشابه نتایج مطالعه حاضر در راستای عدم وجود تفاوت معنادار بین غلظت سرمی ویتامین D افراد بیمار و سالم را گزارش کرده‌اند (۲۲، ۲۳، ۲۴).

تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با تاثیر عوامل محیطی در ابتلا به MS انجام شده است. به نظر می‌رسد فراوانی کمبود ویتامین D نقش مهمی در ایجاد این بیماری دارد. تاکنون چندین مطالعه در ارتباط با MS و غلظت ویتامین D در سرم و مایع مغزی نخاعی انجام شده است که نتایج متفاوتی را نشان داده‌اند.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که افراد مبتلا به MS سطح سرمی پایینی از ویتامین D دارند (۱۹). در این مطالعه نیز کمبود سطح سرمی ویتامین D در هر دو گروه شاهد و بیمار مشاهده گردید. ولی میانگین غلظت این

ایران انجام شد (۵). همچنین تایید کننده‌ی نتایج مطالعه‌ی در استرالیا در سال ۲۰۰۵ نیز می‌باشد (۱۷). اگرچه این پلی مورفیسم‌ها تغییری در ساختار پروتئین ایجاد نمی‌کنند اما نزدیکی آن‌ها به ناحیه‌ی ۳' UTR، ممکن است فرآیند اتصال mRNA به کمپلکس ترجمه، روند تخریب mRNA یا مسیرهای سیگنالینگ را تحت تاثیر قرار دهد (۱۵، ۵). همراهی پلی مورفیسم rs7975232 و عدم همراهی پلی مورفیسم rs731236 با بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند به این دلیل باشد که پلی مورفیسم rs731236 یک واریانت هم‌معنی (Synonymous) آمینواسیدی می‌باشد و تاثیری بر ساختار پروتئین نخواهد گذاشت. اما پلی مورفیسم rs7975232 در ناحیه اینترونی بوده و می‌تواند بر نحوه پیرایش mRNA، ترجمه و روند تخریب آن تاثیر گذارده و بیان کلی ژن رسپتور ویتامین D را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین با توجه به پایین بودن و عدم اختلاف در سطح سرمی ویتامین D در دو گروه کنترل و بیمار و اینکه این دو گروه هیچگونه مکمل ویتامین D مصرف نمی‌کردند، پلی مورفیسم rs7975232 می‌تواند در کاهش توانایی رسپتور ویتامین D در تعامل با این ویتامین و استعداد ابتلا به بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه موثر باشد. برای پیدا کردن رابطه واقعی بین تغییرات ژنتیکی و بیماری MS، تحقیقات گسترده‌تر در ساختار ژن و عملکرد آن با توجه به شرایط بیماران مورد نیاز است.

MS یک بیماری چندعاملی است که بروز آن تحت تاثیر عوامل مختلف ژنتیکی، اپی ژنتیکی و محیطی قرار دارد. مطالعه‌ی نقش عوامل ژنتیکی در بروز MS بسیار گسترده و پیچیده است. چراکه تحلیل این بیماری از نظر ژنتیکی علاوه بر شناسایی، مطالعه و تخمین سهم اثر ژن‌های مختلف دخیل در این بیماری و واریانت‌های موجود در آنها، نیازمند شناسایی و درک میانکنش‌های بین این ژن‌ها و

بطور کلی در تمام مناطق مختلف ایران افراد بطور قابل ملاحظه‌ای به کمبود ویتامین D مبتلا هستند و در این بین استان خوزستان جزء استانهایی است که شیوع کمبود ویتامین D در افراد مشاهده می‌گردد (۲۵). با توجه به اینکه در استان خوزستان تابش شدید نور آفتاب وجود دارد، کمبود ویتامین D در افراد سالم و بیمار در این استان می‌تواند بدلیل مواجهه ناکافی با نور خورشید ناشی از نوع پوشش لباس و آلودگی هوا باشد.

از آنجا که نقش ویتامین D در MS همچنان موضوع بسیاری از تحقیقات است بررسی نقش VDR در MS ضروری است. در واقع عملکرد VDR نشان دهنده‌ی اثر ویتامین D در بدن است و تغییرات ژنتیکی در VDR ممکن است عملکرد VDR را تحت تاثیر قرار دهد. پلی مورفیسم‌های rs731236 و rs7975232 به ترتیب با آنزیم‌های TaqI و ApaI برش می‌خورند. جایگاه برش TaqI بر روی اگزون شماره‌ی ۹ و یک واریانت هم‌معنی (Synonymous) آمینواسید ۳۵۲ یعنی ایزولوسین می‌باشد و جایگاه برش ApaI بین اگزون شماره‌ی ۸ و اگزون شماره‌ی ۹ و هردو در انتهای ۳' ژن VDR می‌باشند. در این مطالعه برای پلی مورفیسم rs731236 همراهی معناداری با بیماری MS مشاهده نشد. این یافته تایید کننده‌ی مطالعه‌ی است که در سال ۲۰۱۳ توسط García-Martín E و همکاران در اسپانیا انجام شد (۱۶) اما در مغایرت با مطالعه‌ی است که در سال ۲۰۱۵ توسط Mehrnaz Narooie-Nejad و همکاران در جمعیت جنوب شرقی ایران انجام شد (۵). همچنین در مغایرت با مطالعه‌ی است که در سال ۲۰۰۵ در استرالیا انجام شد (۱۷). در پلی مورفیسم rs7975232 ژن رسپتور ویتامین D همراهی خوبی با بیماری MS مشاهده شد. این نتایج تایید کننده‌ی مطالعه‌ی است که در سال ۲۰۱۵ توسط Mehrnaz Narooie-Nejad و همکاران در جمعیت جنوب شرقی

می‌توانند تفاوت و تنوع موجود در نتایج مطالعات گذشته و مطالعه‌ی حاضر را توجیه نماید.

قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه شماره ۹۶/۰۳/۰۲/۱۶۶۷۰) تقدیر و قدردانی می‌نمایند. این پژوهش به صورت پایان نامه به شماره ۹۵۱۰۲۹۳ در دانشگاه شهید چمران اهواز به ثبت رسیده است.

واریانت‌ها و همچنین اثرات تجمعی آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این مسائلی مانند تاثیرات اپی‌ژنتیک، تفاوت‌های نژادی (نقش و اثر متفاوت واریانت‌های ژنتیکی موجود در جمعیت‌های نژادی مختلف)، نقش عوامل محیطی و سبک زندگی، معیار و روش انتخاب و تهیه‌ی نمونه‌ها و روش تعیین ژنوتیپ و تحلیل‌های آماری عوامل دیگری هستند که بر پیچیدگی این مطالعات می‌افزایند. لذا عوامل ذکر شده

منابع

- 1-Charcot, Jean-Martin. *Histologie de la sclerose en plaques* 41.5 (1868): 554-556.
- 2-Korn, Thomas, et al... *Pathophysiology of multiple sclerosis*. *Journal of neurology*. 2008; 255: 2-6
- 3-Stern, Joel, and Derin Keskin, et al. *Strategies for the identification of loci responsible for the pathogenesis of multiple sclerosis*. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2008; 13(4): 656-666.
- 4-Sawcer, Stephen, Robin JM Franklin, and Maria Ban, et al. *Multiple sclerosis genetics*. *The Lancet Neurology*. 2014; 13(7): 700-709.
- 5- Narooie-Nejad, Mehrnaz, et al. *Positive association of vitamin D receptor gene variations with multiple sclerosis in South East Iranian population*. *BioMed research international* 2015 (2015).
- 6-Hanwell, Heather EC, and Brenda Banwell, et al. *Assessment of evidence for a protective role of vitamin D in multiple sclerosis*. *Biochimica ET Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2011; 1812(2): 202-212.
- 7-Sotgiu, Stefano, et al. *Seasonal fluctuation of multiple sclerosis births in Sardinia*. *Journal of neurology*. 2006; 253 (1): 38-44.
- 8-Willer, Cristen J., et al. *Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study*. *Bmj*. 2005 330 (7483): 120.
- 9-Pierrot-Deseilligny, Charles, et al. *Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis*. *Journal of neurology*. 2009; 256 (9): 1468-1479.
- 10-Wingerchuk, Dean M, et al. *Environmental Factors in Multiple Sclerosis: Epstein-Barr Virus, Vitamin D, and Cigarette Smoking*. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. 2011; 78 (2): 221-230.
- 11-Ben-Selma, W., et al. *Age-and gender-specific effects on VDR gene polymorphisms and risk of the development of multiple sclerosis in Tunisians: a preliminary study*. *International journal of immunogenetics*. 2015; 42 (3): 174-181.
- 12-Čierny, Daniel, et al. *FokI vitamin D receptor gene polymorphism in association with multiple sclerosis risk and disability progression in Slovaks*. *Neurological research*. 2015; 37 (4): 301-308.
- 13-Deeb, Kristin K., Donald L. Trump, and Candace S. Johnson, et al. *Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics*. *Nature Reviews Cancer*. 2007; 7 (9): 684-700.
- 14-Kraichely, Dennis M., and Paul N. MacDonald, et al. *Transcriptional activation through the vitamin D receptor in osteoblasts*. *Front Biosci*. 1998; 3: d821-833.
- 15-Black, Brian L., and Eric N. Olson, et al. *Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins*. *Annual review of cell and developmental biology*. 1998; 14 (1): 167-196.
- 16-García-Martín, Elena, et al. *Vitamin D3 receptor (VDR) gene rs2228570 (Fok1) and rs731236 (Taq1) variants are not associated with the risk for multiple sclerosis: results of a new study and a meta-analysis*. *PLoS One*. 2013; 8 (6): e65487.
- 17-Tajouri, Lotti, et al. *Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population*. *Journal of neurogenetics*. 2005; 19 (1): 25-38
- 18-Michael F. Holick. *Vitamin D Deficiency*. *New England Journal of Medicine*. 2007; 357:266-281

- 19- Fatimah M, Alharbi. Update in vitamin D and multiple sclerosis. *Neurosciences (Riyadh)*. 2015; 20(4): 329–335.
- 20-Gelfand JM, Cree BA, McElroy J. Vitamin D in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology* 2011; 24: 1824–1830
- 21-Pandit L, Ramagopalan SV, Malli C, D'Cunha A, Kunder R, Shetty R. Association of vitamin D and multiple sclerosis in India. *Mult Scler*. 2013; 19(12):1592-6.
- 22-Hejazi E, Amani R, Sharafaldin Zadeh N, Cheraghian B. Comparison of the dietary intake of vitamin D and serum 25-OH-vitamin D3 levels between multiple sclerosis patients and healthy subjects. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2008; 2 (4):59-66
- 23-Comparison of vitamin D serum levels in new diagnosed patients with multiple sclerosis versus their healthy relatives in ahvaz. Doctoral thesis. Faculty of medicine. Ahvaz Jundishapour University of medical science. 2014.
- 24-Soilu-Hanninen M, Airas L, Mononen I, Heikkila A, Viljanen M, Hanninen A. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2005; 11: 1-6
- 25-Saadinia A, Larijani B, Jalalinia S, Farzadfar F, Keshtkar A, Rezaei E, Esmaeeli I. A study on the prevalence of vitamin D deficiency in the Iranian population living in the Islamic Republic of Iran by province over the period of 1990-2010. *Iranian journal of diabetes and methabolism* 2013; 12(6): 574-584

Association Study of the VDR rs731236 and rs7975232 Polymorphisms with MS in Population of Khuzestan Province

Shadi Ghaemi¹, Mohammad Shafiei^{2*}, Hamid Ghalehdari³, Mehdi Pormehdi Brojeni⁴

1-Master of Science in Genetics.
2-Assistant Professor of Biochemistry.
3-Molecular Geneticist.
4-Associate Professor of Epidemiology.

1,2,3-Department of Genetics, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4-Department of Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author:
Mohammad Shafiei; Department of Genetics, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Tel: +989161711319
Email: m.shafiei@scu.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system (CNS). MS is determined by interaction between genes and environment. In the past decade, much attention has been given to vitamin D and its role in MS. Recent data implicate vitamin D in modulation of the risk as well as clinical course of disease. Since vitamin D acts through the vitamin D receptor (VDR) the aim of our study was to determine the association between the VDR rs731236 and rs7975232 polymorphisms and the MS risk in population of Khuzestan province.

Subjects and Methods: This study comprised 150 MS cases, plus 150 healthy individuals as a control group. For all subjects, level of vitamin D in serum was measured and association of the VDR rs731236 and rs7975232 polymorphisms and the MS risk was determined using PCR amplification and then RFLP. Data was confirmed by direct sequencing. Statistical analyses were performed using SPSS version 16.0.

Results: Level of vitamin D in serum of case and control groups were not differed. The rs731236 polymorphism odds ratios for AA and GG genotypes were 1.2 (P=0.46) and 1.51 (P=0.33) compared with the AG genotype, respectively. The rs7975232 (C/A) polymorphism odds ratios for CA and AA genotypes were 8.65 (P=<0.001) and 1.38 (P=<0.001) compared with the CC genotype, respectively.

Conclusion: The rs7975232 polymorphism in VDR gene did not show association with MS, but rs7975232 polymorphism showed good association with this disease.

Keyword: Polymorphisms, rs731236, rs7975232, VDR, Gene, Multiple sclerosis.

►Please cite this paper as:

Ghaemi Sh, Shafiei M, Ghalehdari H, Pormehdi Brojeni M. Association Study of the VDR rs731236 and rs7975232 Polymorphisms with MS in Population of Khuzestan Province. *Jundishapur Sci Med J* 2017; 16(4):455-465.

Received: Nov 21, 2016

Revised: June 12, 2017

Accepted: July 5, 2017