

## ارتباط پلی مورفیسم قابل شناسایی توسط آنزیم *Bsm I* در ژن گیرنده ویتامین D با بیماری مولتیپل اسکروز در جنوب ایران

دکتر علیرضا نیک‌سرشت<sup>۱</sup>، دکتر بتول دادخواه<sup>۲</sup>، دکتر اسکندر کمالی سروستانی<sup>۳\*</sup>

### خلاصه

مقدمه: ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین  $D_3$ ، شکل فعال ویتامین D بوده و پس از اتصال به گیرنده هسته‌ای اثر مهاری بر سیستم ایمنی دارد. به همین دلیل نقش مهاری ویتامین D در جلوگیری از بروز بیماری مولتیپل اسکروز در مطالعات مختلف نشان داده شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر احتمالی پلی مورفیسم قابل شناسایی توسط آنزیم *Bsm I* در ژن گیرنده ویتامین D با بروز یا شدت بیماری مولتیپل اسکروزیس می‌باشد. روش: در این مطالعه ۲۵۷ بیمار ایرانی مبتلا به مولتیپل اسکروزیس و ۲۹۲ کنترل هم جنس و هم نژاد بررسی شدند. پلی مورفیسم *Bsm I* در ژن گیرنده ویتامین D با روش PCR-RFLP مورد شناسایی قرار گرفت. یافته‌ها: هیچ‌گونه تفاوتی در پراکنش آلل‌ها و ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم *Bsm I* در ژن گیرنده ویتامین D بین گروه بیمار و گروه شاهد مشاهده نگردید ( $P=0/43$ ). نتیجه‌گیری: با توجه به نقش تنظیمی ویتامین  $D_3$  در سیستم ایمنی و اثر مهاری آن بر بیماری مولتیپل اسکروزیس، بررسی سایر پلی مورفیسم‌های ژن گیرنده ویتامین D با بیماری مذکور پیشنهاد می‌شود. واژه‌های کلیدی: مولتیپل اسکروزیس، گیرنده ویتامین D، پلی مورفیسم، ایران

۱- دانشیار گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری‌های خودایمنی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ۲- دستیار گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ۳- استاد

گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری‌های خودایمنی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

\* نویسنده مسؤول، آدرس: مرکز تحقیقات بیماری‌های خود ایمنی، دانشکده پزشکی، فلکه ستاد، شیراز • آدرس پست الکترونیک: Immunol2@sums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۲/۷ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۷/۴/۳۱ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۹/۶

## مقدمه

پلی مورفیسم‌ها، تأثیر پلی مورفیسم قابل شناسایی توسط آنزیم Bsm I در انتهای 3' از ژن VDR (VDR-Bsm I) بر بروز بیماری‌های مختلفی چون پوکی استخوان، سرطان‌ها و بیماری‌های خود ایمن چون دیابت وابسته به انسولین و لوپوس اریتماتوز سیستماتیک گزارش شده است (۱۴،۱۵). لذا به نظر می‌رسد این پلی مورفیسم نقش فعالی را در عملکرد یا میزان تولید VDR بر عهده داشته و در نتیجه می‌تواند در حساسیت به بیماری‌های مذکور مؤثر باشد. از طرفی مطالعات انجام شده بر روی ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن VDR با MS در کشورهای مختلف، نتایج مختلفی به دنبال داشته است (۱۶-۱۸). با توجه به نبود مطالعه مشابه در ایران و با توجه به ارتباط پلی مورفیسم VDR-Bsm I با بیماری‌های مختلف (۱۴،۱۵)، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم VDR-Bsm I با بروز و شدت بیماری MS در بیماران جنوب ایران انجام شد.

## روش بررسی

نمونه مورد مطالعه شامل ۲۶۷ بیمار (۲۰۳ زن و ۶۴ مرد) با انواع بالینی بیماری (عودکننده - خوب‌شونده یا RR-MS، پیش‌رونده ثانویه یا SP-MS و پیش‌رونده اولیه یا PP-MS) و ۲۹۲ کنترل هم جنس و هم نژاد (۲۳۳ زن و ۵۹ مرد) بود. بیماران بر اساس شاخص McDonald مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۹). شدت بیماری بر اساس ضریب EDSS (Kurtzke's expanded disability status scale) مشخص گردید. از تمامی بیماران رضایت‌نامه برای شرکت در مطالعه گرفته شد.

## تکنیک ژن VDR با روش PCR

DNA بر اساس روش Miller و همکاران از خون محیطی افراد تحت مطالعه جداسازی شد (۲۰). به

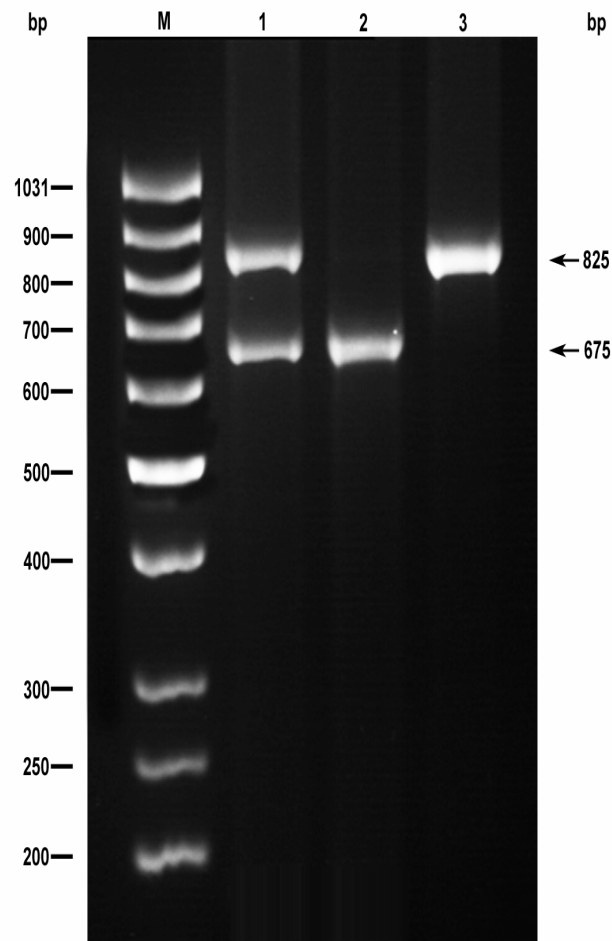
مولتیپل اسکروزیس (MS) یک بیماری خود ایمن ناتوان‌کننده سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد. در این بیماری پاسخ غیر طبیعی سیستم ایمنی به آنتی ژن‌های میلین موجب تخریب میلین و نهایتاً تحلیل آکسون‌ها می‌شود (۱). علت بیماری MS دقیقاً مشخص نشده است ولی اطلاعات ایمنولوژیک و اپیدمیولوژیک موجود نشان دهنده ارتباط عوامل ژنتیکی با بروز MS می‌باشند (۲). از طرفی در چندین مطالعه ارتباط عدم برخورد با نورماوراء بنفش B با بروز MS گزارش شده است (۳-۵). با توجه به آنکه افزایش بروز MS با کاهش میزان برخورد نور ماوراء بنفش B همراه بوده و اشعه ماوراء بنفش B برای تولید ویتامین D<sub>3</sub> ضروری می‌باشد، لذا احتمالاً هورمون ویتامین D می‌تواند به عنوان یکی از مهارکننده‌های طبیعی بیماری MS مطرح باشد (۶). بهترین شاهد از نقش ویتامین D در مهار بیماری MS با مطالعه مدل حیوانی بیماری یا آنسفالومیلیت خود ایمن آزمایشگاهی (EAE) به دست آمده است و در واقع ویتامین D<sub>3</sub> سبب مهار بروز EAE شده (۷-۱۱) و سبب افزایش سرعت بهبودی در حیوان از EAE می‌شود (۱۲). سلول‌های میکروگلیا و نرون‌ها دارای آنزیم 1 $\alpha$ -OHase بوده و لذا به نظر می‌رسد که سیستم اعصاب مرکزی نیز فعالانه در سنتز ویتامین D<sub>3</sub> نقش دارد (۱۳). گزارشات فوق احتمال بروز MS در صورت کاهش میزان ویتامین D<sub>3</sub> را نشان می‌دهند.

ویتامین D<sub>3</sub> با اتصال به گیرنده خود (VDR) اثرات متعددی را بر جای می‌گذارد. جالب آن‌که ترادف نوکلئوتیدی مربوط به ژن کد کننده VDR در افراد مختلف یکسان نبوده و به عبارت دیگر پلی مورفیسم‌های متعددی در این ژن مشاهده می‌گردد. اثر این پلی مورفیسم‌ها بر عملکرد گیرنده هنوز مشخص نشده است. با این وجود از بین این

جهت انجام PCR، یک سیکل به مدت ۵ دقیقه در ۹۴°C و ۳۵ سیکل به شرح ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه. در انتها نیز لوله‌ها به مدت دو دقیقه در ۷۲°C نگهداری شدند. محصول PCR حاوی ۸۲۵ زوج باز می‌باشد. پس از تکثیر، سه میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ بررسی شده و در صورت تکثیر DNA، باقیمانده محصول PCR به مدت ۱۶ ساعت با نیم واحد از آنزیم *Bsm I* (شرکت fermentas، لیتونی) در دمای

کمک دو پرایمر

B:5'- AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG-3'  
A:5'- CCA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3'  
(شرکت fermentas، لیتونی) ترادف حاوی *VDR-Bsm I*  
(۱۵) در حجم کل ۱۰μlit و حاوی مواد زیر تکثیر شد:  
از هر یک از dNTPs (شرکت سیناژن ایران)،  
۱۰۰μm واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase،  
۲/۵mM،  
محلول MgCl<sub>2</sub> ۱۰pm از هر یک از پرایمرها و ۲۵۰ng  
از نقشه DNA.



شکل ۱: نتیجه تأثیر آنزیم *Bsm I* بر محصول حاصل از تکثیر ژن *VDR*

M: مارکر DNA؛ نوار اول مربوط به فرد هتروزیگوت Bb؛ نوار دوم مربوط به فرد هموزایگوت bb؛ نوار سوم مربوط به فرد هموزایگوت BB

در ۲۶۷ فرد مبتلا به MS و ۲۹۲ فرد شاهد نشان می‌دهد. هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در پراکنش آلل B (گروه بیمار=۴۳/۴٪، گروه شاهد=۴۴/۸٪) و آلل b (گروه بیمار=۵۶/۶٪ و گروه شاهد=۵۵/۲٪) مشاهده نگردید ( $P=0/64$ ). هم‌چنین در مقایسه پراکنش ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مورفیسم، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و گروه شاهد مشاهده نشد ( $P=0/43$ ). پس از تقسیم‌بندی افراد مورد مطالعه براساس جنس نیز تفاوت معنی‌داری بین پراکنش آلل‌ها و ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم VDR-Bsm I مشاهده نگردید. به علاوه بین ژنوتیپ‌های حاصل از این پلی‌مورفیسم و اشکال بالینی بیماری ( $P=0/52$ )، فعالیت بیماری ( $P=0/39$ )، ایندکس پیشرفت بیماری ( $P=0/67$ ) و سن بروز بیماری نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ( $P=0/16$ ).

۳VC تیمار می‌شود. در حضور آلل B آنزیم قادر به شکستن محصول PCR نبوده ولی در حضور آلل b، محصول PCR شکسته شده و دو قطعه ۶۲۵ و ۲۰۰ زوج باز تولید می‌نماید (شکل ۱).

از آزمون مجذور کای برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. ارتباط بین داده‌های پیوسته‌ای چون سن بروز بیماری، ضریب EDSS و اندکس پیشرفت بیماری با ژنوتیپ‌های مختلف VDR-Bsm I با آزمون کروسکال والیس مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

در این پژوهش پلی‌مورفیسم ژن VDR پس از تکثیر ژن با پرایمرهای اختصاصی و هضم با آنزیم محدودکننده Bsm I در بیماران مبتلا به MS و گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۱ پراکنش آللی و ژنوتیپی این پلی‌مورفیسم را به تفکیک جنس

جدول ۱: فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های حاصل از پلی‌مورفیسم VDR-BsmI در بیماران مبتلا به MS و گروه شاهد.

P	ژنوتیپ			P	آلل		گروه مورد مطالعه (تعداد)
	Bb (تعداد (درصد))	Bb (تعداد (درصد))	BB (تعداد (درصد))		b (تعداد (درصد))	B (تعداد (درصد))	
۰/۲۴	(۲۸/۴)۶۶	(۵۰/۶)۱۱۸	(۲۱/۰)۴۹	۰/۲۶	(۲۳/۶)۲۵۰	(۴۶/۴)۲۱۶	شاهد (۲۳۳)
	(۳۰/۰)۶۱	(۵۵/۲)۱۱۲	(۱۴/۸)۳۰		(۵۷/۶)۲۳۴	(۴۲/۴)۱۷۲	بیمار (۲۰۳)
۰/۴۲	(۳۷/۳)۲۲	(۴۷/۴)۲۸	(۵۱/۳)۹	۰/۲۶	(۶۱/۰)۷۲	(۳۹/۰)۴۶	شاهد (۵۹)
	(۲۶/۶)۱۷	(۵۳/۱)۳۴	(۲۰/۳)۱۳		(۵۶/۰)۶۸	(۴۷/۰)۶۰	بیمار (۶۴)
۰/۴۲	(۳۰/۱)۸۸	(۵۰/۰)۱۴۶	(۱۹/۹)۵۸	۰/۶۷	(۵۵/۲)۳۲۲	(۴۴/۸)۲۶۲	شاهد (۲۹۲)
	(۲۹/۲)۷۸	(۵۴/۸)۱۴۶	(۱۶/۰)۴۳		(۵۶/۶)۳۰۲	(۴۳/۴)۲۳۲	بیمار (۲۶۷)

مذکور از تکثیر لئوسیت‌ها در حضور میتوژن آنتی‌ژن اختصاصی جلوگیری کرده و تولید سیتوکین‌هایی چون IL-1، IL-2، IL-6 و IFN- $\gamma$  را نیز مهار می‌نماید (۲۱). به علاوه  $1,25 (OH)_2 D_3$  از تولید IL-12 توسط

مطالعات اخیر نشان‌دهنده نقش مهارى هورمون  $1,25 (OH)_2 D_3$  بر سیستم ایمنی هستند. در محیط کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، هورمون

مقایسه با گروه شاهد نشان داده شد (۲۵). در مطالعه دوم که بصورت هاپلوتیپی بر روی دو پلی مورفیسم *Bsm I* و *APa I* در ژن *VDR* و در همان بیماران انجام گردید، افزایش قابل توجه هاپلوتیپ *bA.bA* در بیماران در مقایسه با گروه شاهد نشان داده شد (۲۶). با این وجود در مطالعه حاضر هیچ گونه ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم *VDR-Bsm I* با بروز بیماری *MS* مشاهده نگردید. چندین دلیل برای حصول نتایج مختلف در مطالعات ذکر شده می توان مطرح کرد. دلیل اول تعداد کم بیماران در مطالعه *Fukazawa* و همکاران (۷۷ بیمار و ۹۵ کنترل) در مقایسه با مطالعه حاضر (۲۶۷ بیمار و ۲۹۲ کنترل) می باشد. به عبارت دیگر در صورت وجود متغیرهای مداخله ای، تعداد کم افراد تحت مطالعه در ژاپن می تواند سبب عدم تفاوت آماری معنی دار گردد. دلیل دیگر می تواند تفاوت های نژادی و محیطی در جمعیت های بررسی شده باشد.

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر هیچ گونه ارتباط آماری معنی داری را بین پلی مورفیسم *Bsm I* در ژن *VDR* با حساسیت یا شدت بیماری *MS* در بیماران در جنوب ایران نشان نداد. تناقض موجود در نتایج مطالعات مختلف پژوهش های بیشتر برای تأیید یا رد ارتباط پلی مورفیسم *VDR-Bsm I* با بیماری *MS* را می طلبد.

### سپاسگزاری

از آقایان بهروز غارثی فرد و جمال سروری و هم چنین سرکار خانم دهقان به دلیل کمک در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد. اعتبار مورد نیاز جهت انجام این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز (طرح ۲۷۰۴-۸۴) تأمین گردیده است.

ماکروفاژها و سلول های دندریتیک جلوگیری می نماید (۲۲). این هورمون به طور کامل از بروز مدل حیوانی بیماری *MS* (*EAE*) جلوگیری می نماید (۷-۱۱). به علاوه تا حدودی اثرات محافظتی بارداری بر بیماری *MS* را نیز می توان با توجه به افزایش میزان  $1,25(OH)_2D_3$  در خلال بارداری توجیه کرد (۲۳). این مطالعات نشان می دهند که  $1,25(OH)_2D_3$  مهار کننده سیستم ایمنی بوده و اثرات محافظتی در مقابل بروز بیماری *MS* دارد (۲۴). بنابراین، هرگونه پلی مورفیسمی در ژن گیرنده ویتامین *D* می تواند به عنوان ژن کاندید در حساسیت به بروز *MS* در نظر گرفته شود.

تاکنون چندین مطالعه به بررسی پلی مورفیسم ژن *VDR* در بیماری *MS* پرداخته اند. در برخی از این مطالعات ارتباط دو پلی مورفیسم قابل شناسایی توسط آنزیم های *APa I* و *Taq I* با بیماری *MS* مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶، ۱۷). در این رابطه *Wai* و همکاران به بررسی پلی مورفیسم های ژن *VDR* با بیماری *MS* در کشور انگلیس پرداختند ولی هیچ گونه ارتباطی بین این پلی مورفیسم ها با بیماری مذکور یافت نگردید (۱۶). در مطالعه دیگر توسط *Steckley* و همکاران در کشور کانادا نیز هیچ گونه ارتباطی بین دو پلی مورفیسم *APa I* و *Taq I* در ژن *VDR* با بیماری *MS* مشاهده نگردید (۱۷). با این وجود در مطالعه اخیر انجام شده توسط *Tajouri* و همکاران در سال ۲۰۰۵، ارتباط آماری معنی داری بین دو پلی مورفیسم *APa I* و *Taq I* در ژن *VDR* با بیماری *MS* در کشور استرالیا مشاهده گردید (۱۸).

تاکنون تنها در دو مطالعه ارتباط پلی مورفیسم *VDR-Bsm I* با بیماری *MS* بررسی شده است. مطالعه اول بر روی ۷۷ بیمار مبتلا به *MS* در کشور ژاپن و ۹۵ کنترل انجام گردیده و در آن افزایش بروز آلل *b* ( $P=0/014$ ) یا ژنوتیپ *bb* ( $P=0/026$ ) در بیماران در

## The Association of Vitamin D Receptor Gene *BsmI* Polymorphism with Multiple Sclerosis in Iranian Patients

Niksresht A.R., M.D.<sup>1</sup>, Dadkhah B., M.D.<sup>2</sup>, Kamali Sarvestani E., Ph.D.<sup>3\*</sup>

1. Associate Professor of Neurology, School of Medicine and Autoimmune Diseases Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
2. Resident of Neurology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
3. Professor of Immunology, School of Medicine and Autoimmune Diseases Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

\* Corresponding author, e-mail: immunol2@sums.ac.ir

(Received 26 April 2008      Accepted 26 Nov. 2008)

### Abstract

**Background & Aims:** 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), the biologically active form of vitamin D, exerts an immunosuppressive effect through binding to its specific nuclear receptor. The present case-control study was done to examine the possible association of *BsmI* polymorphism in vitamin D receptor gene (VDR gene) with severity of multiple sclerosis (MS).

**Methods:** 267 Iranian patients with MS and 292 ethnically and sex matched controls were included in this study. *BsmI* polymorphism in VDR gene was assessed by PCR-RFLP method.

**Results:** No differences in the allelic distribution were observed in the patients as compared to the controls. Also no difference in genotype distribution of VDR-*BsmI* polymorphism was observed between patients and controls (p=0.43).

**Conclusion:** Considering the significance of vitamin D<sub>3</sub> as an immune system regulator and its inhibitory effects on MS, investigation on other VDR gene polymorphisms is recommended.

**Keywords:** Multiple sclerosis, Vitamin D, Polymorphism, Iran

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2009; 16(2): 116-123

### References

1. Al-Omaishi J, Bashir R, Gendelman HE. The cellular immunology of multiple sclerosis. *J Leukoc Biol* 1999; 65(4): 444-52.
2. Oksenberg JR, Baranzini SE, Barcellos LF, Hauser SL. Multiple sclerosis: genomic rewards. *J Neuroimmunol* 2001; 113(2): 171-84.
3. Acheson ED, Bachrach CA, Wright FM. Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation and other variables. *Acta Psychiat Scand suppl* 1960; 35(147): 132-47.
4. Freedman DM, Dosemeci M, Alvanja MC. Mortality from multiple sclerosis and exposure to residential and occupational solar radiation: a case-control study based on death certificates. *Occup Environ Med* 2000; 57(6): 418-21.

5. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age- range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain* 2000; 123(pt 5): 968-74.
6. Hayes CE, Contorna MT, Deluca HF. Vitamin D and multiple sclerosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216(1): 21-7.
7. Cantorna MT, Hayes CE, Deluca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(15): 7861-4.
8. Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, Deluca HF. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. *J Immunol* 1998; 160(11): 5314-9.
9. Lemire JM, Archer DC. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 prevents the *in vivo* induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1991; 87(3): 1103- 7.
10. Nashold FE, Hoag KA, Goverman J, Hayes CE. Rag-1-dependent cells are necessary for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2001; 119(1): 16-29.
11. Nataf S, Garcion E, Darcy F, Chabannes D, Muller JY, Brachet P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts regional effects in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55(8): 904-14.
12. Nashold FE, Miller DJ, Hayes CE. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 treatment decreases macrophage accumulation in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2000; 103(2): 171-9.
13. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol* 2003; 49(2): 277-300.
14. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Lecuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338(2): 143-56.
15. Sakulpipatsin W, Verasertniyom O, Natiruj K, Totemchokchyakarn K, Lertsrisatit P, Janwityanujit S. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(2): R48.
16. Yeo TW, Maranian M, Singlehurst S, Gray J, Compston A, Sawser S. Four single nucleotide polymorphisms from the vitamin D Receptor gene in UK multiple sclerosis. *J Neurol* 2004; 251(6): 753-4.
17. Steckley JL, Dymant DA, Sadovnick AD, Risch N, Hayes C, Ebers GC. Genetic analysis of vitamin D related genes in Canadian multiple sclerosis patients. *Neurology* 2000; 54(3): 729-32.
18. Tajouri L, Ovcacic M, Curtain R, Johnson MP, Griffiths LR, Csurhes P, *et al.* Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population. *J Neurogenet* 2005; 19(1): 25-38.

19. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin ED, *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.
20. 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.
21. Trembleau S, Germann T, Gately MK, Adorini L. The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995; 16(8): 383-6.
22. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, *et al.* Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3: Involvement of NF-KB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest* 1998; 101(1): 252-62.
23. Schwartz GG. Hypothesis: Calcitriol mediates pregnancy's protective effect on multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1993; 50(5): 455.
24. Hayes CE. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc* 2000; 59(4): 531-5.
25. Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Hamada T, Miyasaka K, *et al.* Association of vitamin D Receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *Neurol Sci* 1999; 166(1): 47-52.
26. Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Tahiro K. Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles. *J Neurol Sci* 2000; 177(1): 65-71.