

بررسی فراوانی پلی مورفیسم ژن استئوپونین (rs28357094 T > G) و ژن گیرنده ی آن ITGA4 (rs1449263 A > G) در افراد مبتلا به Multiple Sclerosis (MS) در مقایسه با افراد سالم جمعیت اصفهان

فهیمه دادخواه^۱، فرشته آل صاحب فصول^۲، ناهید اسکندری^۳، منصور صالحی^۴، مسعود اعتمادی فر^۵، محمد کاظمی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Multiple sclerosis (MS) یک بیماری خود ایمنی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که عوامل مختلف ژنتیک و محیطی در شیوع آن نقش دارند. با توجه به نقش استئوپونین (OPN یا Osteopontin) و گیرنده ی آن (ITGA4 یا Integrins alpha-4/beta-1) در پاسخ های ایمنی، ژن های کد کننده ی استئوپونین و ITGA4 می توانند به عنوان عواملی جهت بررسی استعداد ابتلا به بیماری MS در نظر گرفته شوند. در مطالعه ی حاضر، فراوانی پلی مورفیسم (rs28357094 T > G) در ژن OPN و پلی مورفیسم (rs1449263 A > G) در ژن ITGA4 در افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: از ۱۰۰ بیمار مبتلا به MS در استان اصفهان به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد نمونه گیری خون انجام شد. ژنوتایپ های rs28357094 و rs1449263 از DNA استخراج شد و با استفاده از تکنیک High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM real time PCR) مورد بررسی قرار گرفت. بررسی آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

یافته ها: در این مطالعه، فراوانی ژنوتایپ TT (OPN-rs28357094) ($P = ۰/۰۲۰$ ، $OR = ۱/۸۵$) و همچنین فراوانی ژنوتایپ AA (ITGA4-rs1449263) ($P = ۰/۰۱۲$ ، $OR = ۲/۱۰$) در افراد مبتلا به MS به طور معنی داری بیشتر از افراد سالم بود.

نتیجه گیری: پلی مورفیسم ژن OPN (rs28357094) و ژن ITGA4 (rs1449263) با استعداد ابتلا به بیماری MS در جمعیت اصفهان مرتبط است.

واژگان کلیدی: Multiple sclerosis، پلی مورفیسم، ژن استئوپونین، ژن ITGA4

ارجاع: دادخواه فهیمه، آل صاحب فصول فرشته، اسکندری ناهید، صالحی منصور، اعتمادی فر مسعود، کاظمی محمد. بررسی فراوانی پلی مورفیسم ژن استئوپونین (rs28357094 T > G) و ژن گیرنده ی آن ITGA4 (rs1449263 A > G) در افراد مبتلا به Multiple Sclerosis (MS) در مقایسه با افراد سالم جمعیت اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۰): ۴۲۹-۴۲۲

می شود (۱). بیشتر از دو میلیون نفر در جهان از این بیماری رنج می برند (۲). این بیماری، به طور عمده بزرگسالان جوان را تحت تأثیر قرار می دهد و وقوع آن در زنان ۲-۳ برابر مردان است. بنا بر آخرین آمار، شیوع بیماری در ایران ۶۰-۲۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر و در استان اصفهان به میزان ۷۳/۳ در ۱۰۰۰۰۰ نفر می باشد (۳). اتیولوژی

مقدمه

Multiple sclerosis (MS) یک بیماری خود ایمن مزمن و پیچیده است که با التهاب، دمیالینه شدن و تخریب آکسون ها در سیستم عصبی مرکزی (CNS یا Central nervous system) مشخص می شود و با حمله به غلاف میلین سلول های عصبی، منجر به آسیب نورون ها

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی شناسی، دانشکده ی پزشکی و کمیته ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه ایمنی شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استاد، گروه مغز و اعصاب، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: alsahebfosoul@med.mui.ac.ir

نویسنده ی مسؤو: فرشته آل صاحب فصول

SNP <G>443C- پیشنهاد شده است. نتایج بیانگر آن است که وجود SNP مورد نظر در موقعیت 66- تا 50 درصد فعالیت پروموتور را کاهش می دهد (22).

ITGA4 بر روی کروموزوم 2 قرار گرفته است و نتایج تحقیق O'Doherty و همکاران حاکی از آن است که آلل C پلی مورفیسم rs1449263 C/T در پروموتور ژن ITGA4 در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشته است (23).

با توجه به شیوع بالای بیماری MS در استان اصفهان و تفاوت عوامل ژنتیک، نژادی و محیطی همچون عرض جغرافیایی، میزان در معرض بودن نور خورشید (سطح ویتامین D) در کشورها و مناطق مختلف جهان، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی پلی مورفیسم rs1449263 در پروموتور ژن OPN و پلی مورفیسم rs28357094 در پروموتور ژن ITGA4 در بیماران مبتلا به Relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) در مقایسه با گروه شاهد سالم انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، 100 بیمار مبتلا به RRMS که بیماری آن‌ها به تأیید متخصص مغز و اعصاب رسیده بود، به عنوان گروه مورد و 100 نفر از افراد سالم مراجعه کننده به سازمان انتقال خون اصفهان، بدون سابقه‌ی بیماری التهابی که از نظر سن و نژاد با بیماران سازگار بودند، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. این مطالعه، توسط کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأیید شده و از همه‌ی افراد رضایت‌نامه‌ی کتبی اخذ گردید.

نمونه‌گیری و استخراج DNA: از هر فرد به مقدار 2 سی سی خون در لوله‌های حاوی Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) جمع‌آوری شد. DNA از نمونه‌ی خون طبق دستورالعمل کیت استخراج DNA (شرکت Genet Bio-Korea) استخراج شد. کمیت DNA استخراج شده با اندازه‌گیری چگالی نوری (OD یا Optical density) آن در 260 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر و کیفیت آن با الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1/5 درصد بررسی شد.

تعیین ژنوتایپ: در این تحقیق، پلی مورفیسم (G>66T-) rs28357094 در پروموتور ژن OPN و (G>A) rs1449263 در پروموتور ژن گیرنده‌ی استئوپونین (ITGA4) با روش High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM real time PCR) بررسی شد. توالی پرایمرهای هر دو ژن توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی و جهت سنتز ارسال شد (Macrogene; Korea) (جدول 1).

جهت انجام چرخه‌ی PCR و آنالیز HRM از دستگاه و نرم‌افزار

بیماری MS نامشخص است، اما عقیده بر این است که این بیماری، از تعامل پیچیده بین عوامل ژنتیک و عوامل محیطی تأثیر می‌پذیرد (4). شماری از گونه‌های ژنتیک به عنوان عوامل افزایش دهنده‌ی خطر ابتلا به بیماری شناخته شده‌اند (5).

Osteopontin (OPN)، یک سیتوکاین پیش‌التهابی است که توسط سلول‌های ایمنی شامل نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، ماست سل‌ها و لنفوسیت‌های B و به ویژه لنفوسیت‌های T، ماکروفاژها و سلول‌های Natural killer (NK) تولید می‌شود. این سیتوکاین، نقش مهمی در ترمیم بافت‌ها، فیبروزیس، تنظیم ایمنی، التهاب و متاستاز دارد (6-7). مطالعات نشان داده است که OPN در بیماری MS نقش دارد و منجر به افزایش پاسخ‌های پیش‌التهابی سلول‌های T helper1 (Th1) و Th17 و مهار پاسخ سلول‌های Th2 می‌شود که بر پیشرفت بیماری تأثیر می‌گذارد (8-12). نقش OPN از طریق القای تولید IL12 Interleukin12 (IL12) و مهار تولید IL10 ایفا می‌شود (13). در طول التهاب، OPN چسبندگی و فراخوانی نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های T را از طریق باند شدن به اینتگرین‌های β_1 و انواعی از گیرنده‌های اسید هیالورونیک CD44 تنظیم می‌کند (14-15).

اینتگرین $\alpha_4\beta_1$ (ITGA4) یا $\alpha_4\beta_1$ (Integrins) گیرنده‌ی استئوپونین که به عنوان Very late antigen-4 (VLA4) هم نام برده می‌شود، یک مولکول چسبنده است که توسط سلول‌های T بیان و باعث ورود سلول‌های اجرایی به داخل مغز می‌شود.

لیگاندهای مربوط به اینتگرین، VCAM1 (Vascular cell adhesion molecule 1) و OPN هستند که بر روی اندوتلیوم ملتهب مغز در ماتریکس خارج سلولی حاشیه‌ی عروق بیان می‌شوند. در اثر اتصال اینتگرین با لیگاندهای مربوط، سلول‌های T از طریق دیاپدز و مهاجرت از بین سلول‌های اندوتلیوم وارد CNS می‌شوند. اتصال OPN به ITGA4 منجر به افزایش بیان ژن‌های حیاتی و ژن‌های سیتوکاین‌های سلول‌های Th1 و Th17 می‌شود. در مغز، ترشح سیتوکاین‌ها از قبیل OPN توسط لنفوسیت‌های T و سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن به الیگودندروسیت‌ها که تولید کننده‌ی میلین هستند، آسیب می‌زند (16-17).

ژن OPN انسانی یا فسفوپروتئین 1 ترشحی (Secreted phosphoprotein 1 یا SPP1) بر روی کروموزوم 4 قرار گرفته است و بعضی از پلی مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs یا Single nucleotide polymorphisms) آن با توسعه، فعالیت بیماری و یا هر دو، در چندین بیماری خود ایمنی مرتبط هستند (18-21). اختلاف در بیان OPN ممکن است به علت وجود گونه‌هایی در منطقه‌ی پروموتور ژن OPN باشد که فعالیت ترجمه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این نقش، برای G>GG-66T، G>GG-156 و

جدول ۱. توالی پرایمرهای مربوط به پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه

| Gene | SNP | Location | Allele | Product Size (bp) | Primer |
|-------|-------------|----------|--------|-------------------|--|
| OPN | rs:28357094 | Promoter | T → G | 248 | F:5'-AAAACCAGAGGGGGAAGTGT-3' R:5'-CCCAGTAGCAAAGCTG-3' |
| ITGA4 | rs:1449263 | Promoter | G → A | 236 | F:5'-TGCCCACTATATGCCAAAAA-3' R:5'-GGAAACTCAGAGTGGCCAGA-3' |

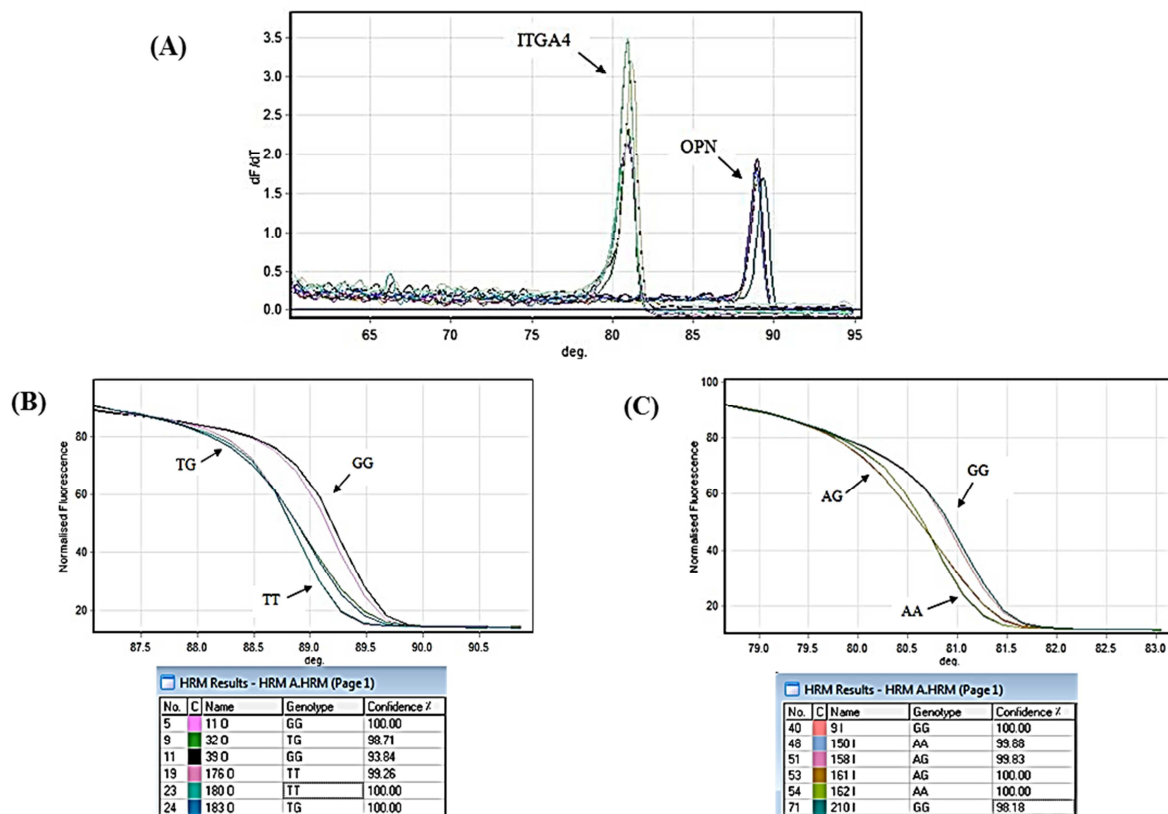
OPN: Osteopontin; ITGA4: Integrins alpha-4/beta-1; SNP: Single nucleotide polymorphisms

۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس، ۴۰ چرخه (شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، گسترش ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و در نهایت مرحله‌ی ذوب (شکل ۱- A) از ۹۵-۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با افزایش ۰/۲ درجه بر ثانیه اجرا شد. جهت مشاهده‌ی باند ژن‌های مورد نظر و اطمینان از صحت انجام PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. همچنین، درصدی از نمونه‌ها جهت تعیین توالی فرستاده شد (شکل ۲). (Bioneer; Korea)

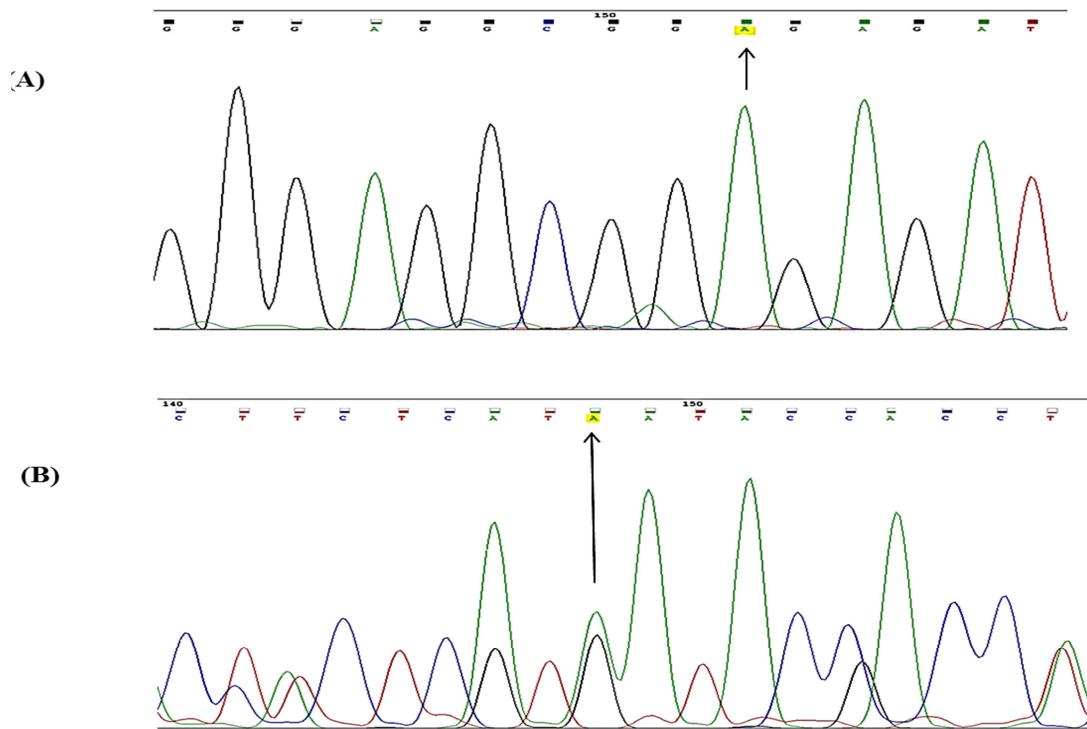
HRM real time PCR و کیت Corbett (Rotor-Gene6000)

(Solis Bio Dyne company- Estonia) استفاده شد.

واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر از MasterMix5x (DNA پلیمریزاسیون، dNTP، واگترین)، ۰/۱ میکرولیتر پرایمر Forward (۱۰ پیکومول)، ۰/۱ میکرولیتر پرایمر Reverse (۱۰ پیکومول)، ۵/۸ میکرولیتر H₂O و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده انجام شد. چرخه‌ی PCR به صورت یک مرحله‌ی فعال‌سازی اولی



شکل ۱. A: منحنی ذوب پلی مورفیسم rs28357094 T>G (OPN) Osteopontin و rs1449263 A>G (ITGA4) Integrins alpha-4/beta-1. B: منحنی‌های نرمالیزه شده‌ی سه ژنوتایپ پلی مورفیسم rs28357094 T>G در نمونه‌های مختلف. C: منحنی‌های نرمالیزه شده‌ی سه ژنوتایپ پلی مورفیسم rs1449263 A>G در نمونه‌های مختلف. محور افقی، درجه‌ی حرارت و محور عمودی، شدت نور فلورسانس را نشان می‌دهد.



شکل ۲. A: نتیجه‌ی Sequencing پلی‌مورفیسم T>G rs28357094 هموزیگوت TT ژن Osteopontin (OPN) با استفاده از پرایمر Reverse. B: نتیجه‌ی Sequencing پلی‌مورفیسم A>G rs1449263 هتروزیگوت AG ژن Integrins alpha-4/beta-1 (ITGA4) با استفاده از پرایمر Forward

در این مطالعه، از آزمون‌های Independent t جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها و آزمون χ^2 برای مقایسه‌ی فراوانی آلل و توزیع ژنوتایپ بین گروه مورد و شاهد استفاده شد. ارتباط همبستگی پلی‌مورفیسم ژن OPN و ژن ITGA4 با بیماری MS با اندازه‌گیری تخمین شانس خطر ابتلا (OR یا Odd ratio) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (۹۵ درصد CI) مورد بررسی قرار گرفت. جهت کنترل اثر مخدوشگر ناهمگنی توزیع جنس در دو گروه، از آزمون Mantel-Haenszel استفاده شد. معادله‌ی Hardy-Weinberg با استفاده از آزمون χ^2 مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، جهت بررسی آماری مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

در این پژوهش، ۱۰۰ بیمار مبتلا به MS (گروه مورد) و ۱۰۰ فرد سالم (گروه شاهد) مورد مطالعه قرار گرفتند. اطلاعات توصیفی هر دو گروه در جدول ۲ آمده است. آزمون Independent t تفاوت قابل توجهی بین میانگین سن افراد در دو گروه نشان نداد ($P = ۰/۲۷۰$).

در این مطالعه، از آزمون‌های Independent t جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها و آزمون χ^2 برای مقایسه‌ی فراوانی آلل و توزیع ژنوتایپ بین گروه مورد و شاهد استفاده شد. ارتباط همبستگی پلی‌مورفیسم ژن OPN و ژن ITGA4 با بیماری MS با اندازه‌گیری تخمین شانس خطر ابتلا (OR یا Odd ratio) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (۹۵ درصد CI) مورد بررسی قرار گرفت. جهت کنترل اثر مخدوشگر ناهمگنی توزیع جنس در دو گروه، از آزمون Mantel-Haenszel استفاده شد. معادله‌ی Hardy-Weinberg با استفاده از آزمون χ^2 مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه،

جدول ۲. اطلاعات توصیفی گروه‌های مورد مطالعه

| متغیر | گروه مورد تعداد (درصد) | گروه شاهد تعداد (درصد) | مقدار P |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| سن (میانگین \pm انحراف معیار) | ۳۱/۳ \pm ۸/۸ | ۳۲/۶ \pm ۸/۳ | ۰/۲۷۰ |
| جنس | مرد | ۱۹ (۱۹) | ۰/۰۰۱ |
| | زن | ۸۱ (۸۱) | |
| EDSS | ۱ | ۹۰ (۹۰) | - |
| | ۱/۵ | ۶ (۶) | - |
| | ۲ | ۳ (۳) | - |
| | ۳ | ۱ (۱) | - |
| جمع کل | ۱۰۰ (۱۰۰) | ۱۰۰ (۱۰۰) | |

EDSS: Expanded disability status score

جدول ۳. نتایج High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM-Real Time PCR) پلی مورفیسم rs28357094 T>G ژن Osteopontin (OPN) در دو گروه

| متغیر | گروه مورد تعداد (درصد) | گروه شاهد تعداد (درصد) | مقدار P | OR (95% CI) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| فراوانی ژنوتایپ | TT ۷۱ (۷۱/۰) | ۵۷ (۵۷/۰) | - | Reference |
| | TG ۲۶ (۲۶/۰) | ۳۹ (۳۹/۰) | ۰/۰۴۰ | OR = ۰/۵۳ (۰/۲۹-۰/۹۸) |
| | GG ۳ (۳/۰) | ۴ (۴/۰) | ۰/۵۱۰ | OR = ۰/۶۰ (۰/۱۲-۲/۸۰) |
| | TT ۷۱ (۷۱/۰) | ۵۷ (۵۷/۰) | ۰/۰۲۰ | OR = ۱/۸۵ (۱/۰۳-۳/۳۲) |
| | TG + GG ۲۹ (۲۹/۰) | ۴۳ (۴۳/۰) | - | Reference |
| فراوانی آلل | T ۱۶۸ (۸۴/۰) | ۱۵۳ (۷۶/۵) | ۰/۰۶۰ | OR = ۱/۶۱ (۰/۹۷-۲/۶۶) |
| | G ۳۲ (۱۶/۰) | ۴۷ (۲۳/۵) | | |

CI: Confidence interval; OR: Odd ratio

rs1449263 (در ژن ITGA4) در دو گروه مورد مطالعه، متفاوت بود. توزیع فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت AA در افراد بیمار به طور معنی داری بیشتر از افراد سالم بود ($P = ۰/۰۱۲$)؛ به طوری که حدود ۲ برابر بیشتر شانس ابتلا به بیماری MS را نسبت به افراد فاقد این ژنوتایپ داشتند ($OR = ۲/۱۰۰$). فراوانی آلل A در گروه مورد بیشتر از گروه سالم بود ($OR = ۱/۳۵۰$)؛ هر چند این اختلاف معنی دار نبود ($P = ۰/۱۳۰$). نتایج به دست آمده نشان می دهد که ممکن است پلی مورفیسم مورد نظر در ژن ITGA4 با استعداد ابتلا به بیماری MS در ارتباط باشد (جدول ۴) (شکل ۱- C).

آزمون Mantel-Haenszel نشان داد که اگر توزیع جنس در هر دو گروه یکسان بود، باز هم فراوانی ژنوتایپ در بین دو گروه معنی دار می شد. بنا بر این، در مطالعه حاضر، ناهمگن بودن جنس نمی تواند به عنوان متغیر مخدوشگر عمل کند.

توزیع ژنوتایپ در دو گروه مورد و شاهد با معادله Hardy-Weinberg سازگاری داشت. آزمون نشان داد که توزیع فراوانی پلی مورفیسم rs28357094 T>G (در ژن OPN) در دو گروه مورد و شاهد متفاوت بود. توزیع فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت TT در افراد گروه مورد، به طور معنی داری بیشتر از افراد گروه شاهد بود ($P = ۰/۰۲۰$)؛ به گونه ای که این افراد حدود ۲ برابر بیشتر شانس ابتلا به بیماری MS را نسبت به افراد فاقد این ژنوتایپ داشتند ($OR = ۱/۸۵۰$). همچنین، فراوانی آلل T در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد بود ($OR = ۱/۶۱۰$)؛ هر چند این اختلاف معنی دار نبود ($P = ۰/۰۶۰$). نتایج نشان داد که پلی مورفیسم مورد نظر در ژن OPN، ممکن است با استعداد ابتلا به بیماری MS در ارتباط باشد (جدول ۳) (شکل ۱- B).

نتایج آزمون نشان داد که توزیع فراوانی پلی مورفیسم

جدول ۴. نتایج High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM real time PCR) پلی مورفیسم rs1449263 در ژن Integrins alpha-4/beta-1 (ITGA4) در دو گروه

| متغیر | گروه مورد تعداد (درصد) | گروه شاهد تعداد (درصد) | مقدار P | OR (95% CI) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------|-----------------------|
| فراوانی ژنوتایپ | AA ۳۳ (۳۳/۰) | ۱۹ (۱۹/۰) | - | Reference |
| | AG ۳۶ (۳۶/۰) | ۴۹ (۴۹/۰) | ۰/۰۱۶ | OR = ۰/۴۲ (۰/۲۰-۰/۸۶) |
| | GG ۳۱ (۳۱/۰) | ۳۲ (۳۲/۰) | ۰/۱۳۰ | OR = ۰/۵۵ (۰/۲۶-۱/۱۸) |
| | AA ۳۳ (۳۳/۰) | ۱۹ (۱۹/۰) | ۰/۰۱۲ | OR = ۲/۰۱ (۱/۰۹-۴/۰۲) |
| | AG + GG ۶۷ (۶۷/۰) | ۸۱ (۸۱/۰) | | Reference |
| فراوانی آلل | A ۱۰۲ (۵۱/۰) | ۸۷ (۴۳/۵) | ۰/۱۳۰ | OR = ۱/۳۵ (۰/۹۱-۲/۰۰) |
| | G ۹۸ (۴۹/۰) | ۱۱۳ (۵۶/۵) | | |

CI: Confidence interval; OR: Odd ratio

بحث

همکاران نیز نشان داده است که عامل ترجمه‌ی SP1 به آلل T متصل می‌شود؛ از این رو، جایگزینی آلل T با G، می‌تواند در بیان استئوپونین نقش داشته باشد (۲۹). با توجه به این که استئوپونین در تعادل بین Th1/Th2 نقش دارد، وجود پلی‌مورفیسم در موقعیت 66- ممکن است با پاسخ‌های Th1/Th2 و بیماری‌های خود ایمن از جمله MS مرتبط باشد.

بررسی نتایج مطالعه‌ی حاضر مبنی بر افزایش ژنوتایپ TT افراد گروه مورد در مقایسه با افراد گروه شاهد و مطالعات پیش‌گفته، نشان می‌دهد که ممکن است وجود ژنوتایپ TT احتمال ابتلا به بیماری MS را افزایش دهد و بدین ترتیب، این پلی‌مورفیسم با بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه مرتبط باشد.

با توجه به نقش اینترگرین 4β1α (ITGA4) گیرنده‌ی استئوپونین، در ورود سلول‌های اجرایی به داخل مغز، این بخش از مطالعه به بررسی فراوانی ژنوتایپ‌های پلی‌مورفیسم A>G rs1449263 (در ژن ITGA4) در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد و ارتباط آن با استعداد ابتلا به این بیماری در جمعیت اصفهان پرداخته است. نتایج این مطالعه، نشان داد که فراوانی ژنوتایپ AA در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد سالم می‌باشد و ارتباط معنی‌داری بین ژنوتایپ AA و استعداد ابتلا به این بیماری وجود دارد. بنا بر این، ممکن است این پلی‌مورفیسم، با استعداد ابتلا به بیماری MS مرتبط باشد. گرچه نتایج مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌ی O'Doherty و همکاران در مورد ارتباط پلی‌مورفیسم rs1449263 C/T در ژن ITGA4 با بیماری MS همسویی ندارد (۲۳)، این تناقض ممکن است به دلیل تفاوت‌های نژادی، تفاوت‌های ژنتیک، تفاوت در عوامل محیطی (عرض جغرافیایی) و میزان مواجهه با نور خورشید باشد.

به نظر می‌رسد تحقیق حاضر، بیانگر ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های T>G rs28357094 در ژن OPN و A>G rs1449263 در ژن ITGA4 با بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه باشد؛ البته پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی دقیق‌تر نقش این ژن‌ها در بروز بیماری MS، مطالعات آینده با حجم نمونه‌ی بیشتر انجام گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی کارشناسی ارشد فهیمة دادخواه (با کد پژوهشی ۳۹۳۷۸۴) می‌باشد که توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد حمایت مالی قرار گرفته است. لازم است از تمامی کسانی که ما را در این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی نماییم.

نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تعادل Th1/Th2 در تحریک و تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش دارد (۲۴). همچنین، سلول‌های Th1 و Th17 نقش مهمی در ایمنوپاتوژنز بیماری MS ایفا می‌کنند (۲۵). استئوپونین در سلول‌های Th1 بیشتر از سلول‌های Th2 بیان می‌شود (۲۶). اتصال OPN به ITGA4، منجر به افزایش بیان ژن سیتوکاین‌های سلول‌های Th1 و Th17 می‌شود. با توجه به نقش استئوپونین و گیرنده‌ی آن (ITGA4) در پاسخ‌های ایمنی و التهاب، ژن‌های کدکننده‌ی استئوپونین و ITGA4 می‌توانند به عنوان عواملی برای بررسی استعداد ابتلا به بیماری MS در نظر گرفته شوند (۱۷).

اختلاف در بیان OPN، ممکن است به علت وجود گونه‌های متنوع در منطقه‌ی پروموتور ژن OPN باشد که فعالیت ترجمه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این نقش، برای T>G -66، G>GG -156 و C>T -443 پیشنهاد شده است (۲۲).

در این مطالعه، فراوانی ژنوتایپ‌های پلی‌مورفیسم (66-) rs28357094 T>G در ژن OPN در بیماران مبتلا به بیماری MS (گروه مورد) استان اصفهان در مقایسه با افراد سالم (گروه شاهد) و همچنین ارتباط آن با استعداد ابتلا به این بیماری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که فراوانی ژنوتایپ TT در افراد گروه مورد بیشتر از افراد گروه شاهد بوده و رابطه‌ی معنی‌داری بین ژنوتایپ TT و استعداد ابتلا به این بیماری وجود داشته است. بر اساس جستجوهای انجام شده در پایگاه‌های معتبر علمی، مطالعاتی در مورد ارتباط این پلی‌مورفیسم با سایر بیماری‌های خود ایمن مشابه با مکانیسم ایمنولوژی بیماری MS از قبیل دیابت نوع ۱ و لوپوس اریتماتوز (Systemic lupus erythematosus یا SLE) انجام شده است (۲۸-۲۷). در حالی که هیچ مطالعه‌ی مورد-شاهدی مبنی بر همبستگی میان T>G rs28357094 در ژن OPN با بیماری MS گزارش نشده است.

مطالعه‌ی انجام شده توسط Giacopelli و همکاران نشان داده است که پلی‌مورفیسم ژن OPN در موقعیت (66-) rs28357094 T>G Affinity اتصال به عوامل نسخه‌برداری SP1/SP3 را تغییر می‌دهد. عوامل پیش‌گفته، این جایگاه را تشخیص می‌دهند و آلل T در توالی تشخیصی SP1 میل پیوندی بالاتری برای اتصال به این عامل دارد؛ بنا بر نتایج این تحقیق، وجود این SNP (جایگزینی آلل T با G) در این ناحیه تا ۵۰ درصد فعالیت پروموتور را کاهش می‌دهد (۲۲). علاوه بر این، مطالعه‌ی دیگری توسط Hummelshoj و

References

- Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2012; 142(1): 2-8.
- Pandit L, Ban M, Sawcer S, Singhal B, Nair S, Radhakrishnan K, et al. Evaluation of the established non-MHC multiple sclerosis loci in an Indian population. *Mult Scler* 2011; 17(2): 139-43.
- Etemadifar M, Maghzi AH. Sharp increase in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Isfahan, Iran. *Mult Scler* 2011; 17(8): 1022-7.
- Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 2010; 9(7): 727-39.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; 3(2): 104-10.
- Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19(5-6): 333-45.
- Poggi A, Zocchi MR. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. *Front Immunol* 2014; 5: 27.
- Glas J, Seiderer J, Bayrle C, Wetzke M, Fries C, Tillack C, et al. The role of osteopontin (OPN/SPP1) haplotypes in the susceptibility to Crohn's disease. *PLoS One* 2011; 6(12): e29309.
- Shimizu Y, Ota K, Ikeguchi R, Kubo S, Kabasawa C, Uchiyama S. Plasma osteopontin levels are associated with disease activity in the patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol* 2013; 263(1-2): 148-51.
- Kaleta B. Role of osteopontin in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014; 62(6): 475-82.
- Zhang F, Luo W, Li Y, Gao S, Lei G. Role of osteopontin in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2015; 35(4): 589-95.
- Murugaiyan G, Mittal A, Weiner HL. Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *J Immunol* 2008; 181(11): 7480-8.
- O'Regan AW, Hayden JM, Berman JS. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68(4): 495-502.
- Bornsens L, Khademi M, Olsson T, Sorensen PS, Sellebjerg F. Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2011; 17(1): 32-42.
- Salvi V, Scutera S, Rossi S, Zucca M, Alessandria M, Greco D, et al. Dual regulation of osteopontin production by TLR stimulation in dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2013; 94(1): 147-58.
- Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol* 2007; 8(1): 74-83.
- Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(6): 440-7.
- Chiocchetti A, Orilieri E, Cappellano G, Barizzone N, D'Alfonso S, D'Annunzio G, et al. The osteopontin gene +1239A/C single nucleotide polymorphism is associated with type 1 diabetes mellitus in the Italian population. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23(1): 263-9.
- Barizzone N, Marchini M, Cappiello F, Chiocchetti A, Orilieri E, Ferrante D, et al. Association of osteopontin regulatory polymorphisms with systemic sclerosis. *Hum Immunol* 2011; 72(10): 930-4.
- D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, et al. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52(2): 539-47.
- Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, et al. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 2004; 103(4): 1376-82.
- Giacopelli F, Marciano R, Pistorio A, Catarsi P, Canini S, Karsenty G, et al. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics* 2004; 20(1): 87-96.
- O'Doherty C, Roos IM, Antiguada A, Aransay AM, Hillert J, Vandenbroeck K. ITGA4 polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007; 189(1-2): 151-7.
- Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003; 8(3): 223-46.
- Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(6): 393-407.
- Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T, Toyoda N, Satoh T, Suzuki T, et al. Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells. *Int Immunol* 2001; 13(3): 367-76.
- Marciano R, D'Annunzio G, Minuto N, Pasquali L, Santamaria A, Di DM, et al. Association of alleles at polymorphic sites in the Osteopontin encoding gene in young type 1 diabetic patients. *Clin Immunol* 2009; 131(1): 84-91.
- Kariuki SN, Moore JG, Kirou KA, Crow MK, Utset TO, Niewold TB. Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009; 10(5): 487-94.
- Hummelshoj T, Ryder LP, Madsen HO, Odum N, Svejgaard A. A functional polymorphism in the Eta-1 promoter is associated with allele specific binding to the transcription factor Sp1 and elevated gene expression. *Mol Immunol* 2006; 43(7): 980-6.

Evaluation of the Frequency of Osteopontin Gene Polymorphism (rs28357094 T > G) and its Receptor Gene (ITGA4- rs1449263 A > G) in Multiple Sclerosis Patients in Comparison to Healthy Controls in Isfahan, Iran, Population

Fahimeh Dadkhah¹, Fereshteh Alsahebhosoul², Nahid Eskandari², Mansour Salehi³, Masoud Etemadifar⁴, Mohammad Kazemi⁴

Original Article

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Various factors including genetic and environmental factors are involved in the prevalence of MS. The Osteopontin (OPN) and its receptor Integrins alpha-4/beta-1 (ITGA4) have important role in immune response, so their encoding gene could be considered as a candidate for susceptibility to MS diseases. In the present study, we evaluated the frequency of OPN (rs28357094T > G) and ITGA4 (rs1449263A>G) polymorphisms in MS patients compared with healthy controls in Isfahan, Iran population.

Methods: Blood samples were collected from 100 patients with multiple sclerosis and 100 healthy controls. After DNA extraction, OPN (rs28357094) and ITGA4(rs1449263) polymorphisms were detected with high resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM Real Time PCR) technique. The results were analyzed with the SPSS software.

Findings: In this study, frequency of TT genotype (OPN-rs28357094) (P = 0.020, OR = 1.85) and AA genotype (ITGA4 - rs1449263) (P = 0.012, OR = 2.10) in Patients with multiple sclerosis were higher than the control group significantly.

Conclusion: The results of this study show that rs28357094 T>G on OPN gene and ITGA4-rs1449263A > G polymorphisms were associated with susceptibility to multiple sclerosis in Isfahan population.

Keywords: Multiple sclerosis, Polymorphism, OPN gene, ITGA4 gene

Citation: Dadkhah F, Alsahebhosoul F, Eskandari N, Salehi M, Etemadifar M, Kazemi M. **Evaluation of the Frequency of Osteopontin Gene Polymorphism (rs28357094 T>G) and its Receptor Gene (ITGA4-rs1449263 A>G) in Multiple Sclerosis Patients in Comparison to Healthy Controls in Isfahan Population.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(380): 422-9.

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

4- Professor, Department of Neurosciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

5- PhD Student, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Fereshteh Alsahebhosoul, Email: alsahebhosoul@med.mui.ac.ir