مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۷، شماره‌ی ۶۷، تابستان ۱۳۸۸، صفحات ۱ تا ۱۰

بررسی فراوانی پلی‌مرفیسم‌های ژن گیرنده‌ی ویتامین D در مبتلایان به سل ریوی و ارتباط آن با تمایل به ابتلا

دکتر سیدمهران مرعشیان[۱]، دکتر پریسا فرنیا[۲]، شیما سیف[۳]، صابر انوشه[۴]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی mehranmarashian@gmail.com

دریافت: ۸۷/۹/۱۳ پذیرش: ۸۸/۴/۷

چکیده

زمینه و هدف: *اختلافات فردی در بروز یا عدم بروز بیماری فعال سل شرایط را برای مطالعات فراوانی در خصوص علل زمینه‌ای از قبیل ژنتیک میزبان در ابتلا به این بیماری فراهم کرده است که از این بین می‌توان به مطالعات بر روی آنتی ژن لکوسیتی انسانی، گیرنده‌ی ویتامین D، پروتئین ماکروفاژی مرتبط با مقاومت طبیعی از نوع 1، لکتین متصل شونده به مانوز و نیز فاکتور نکروز تومووری اشاره نمود. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی‌مرفیسم‌های ژن بیان کننده‌ی گیرنده‌ی ویتامین D شامل ApaI، BsmI، FokI و TaqI با تمایل به ابتلا به بیماری سل ریوی انجام گردید.*

روش بررسی: *این مطالعه به‌صورت یک تحقیق مورد-شاهدی صورت گرفت. گروه مورد مشتمل بر ۱۶۴ بیمار و گروه شاهد ۵۰ نفر افراد سالم در معرض خطر سل بودند. پس از تعیین ژنوتیپ‌های مربوط به هر جایگاه اختصاصی ژن گیرنده‌ی ویتامین D، فراوانی آن‌ها در هر گروه بدست آمده، پس از مقایسه‌ی دو گروه مورد و شاهد از نظر این فراوانی‌ها و تعیین نسبت شانس و فاصله‌ی اطمینان برای هر ژنوتیپ به توصیف ارتباط بین ژنوتیپ‌های خاص با بروز یا عدم بروز بیماری سل پرداخته شد.*

یافته‌ها: *در مقایسه‌ی گروه‌های مذکور از نظر فراوانی پلی‌مرفیسم‌ها، ژنوتیپ هاپلوئید AbfT و دیپلوئید AAbbFfTT تنها ژنوتیپ‌هایی بودند که از نظر آماری بین دوگروه اختلاف فراوانی معنی‌دار داشتند.*

نتیجه‌گیری: *دو ژنوتیپ AbfT و AAbbFfTT دارای اثر حمایتی در برابر ابتلا به سل تشخیص داده شدند، اما هیچ ژنوتیپی با نقش زمینه‌سازی ابتلا به سل یافت نشد. برای بیان دقیق‌تر و تعمیم یافته‌ها نیاز به مطالعه‌ای با شرکت کننده‌های بیشتر و در نتیجه قدرت بالاتر اجتناب ناپذیر است.*

واژگان کلیدی: سل ریوی، گیرنده‌ی ویتامین D، پلی‌مرفیسم

۱- پزشک عمومی، MPH، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید دکتر بهشتی.

۲- دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید دکتر بهشتی.

۳- کارشناس زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری.

۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

یک سوم جمعیت جهان و به‌عبارتی حدود ۲/۵ میلیارد نفر در حال حاضر آلوده به میکروب سل هستند (۱). در هر ثانیه یک نفر از افراد آلوده به بیماری سل مبتلا می‌شوند (۲). بیشترین میزان سل به‌صورت سل مخفی (Latent TB) است. اما از بین هر ۱۰ نفر موارد سل مخفی، یک نفر بطور متوسط، سل فعال را بروز می‌دهد که در صورت عدم درمان مناسب بیش از نیمی از ایشان دچار مرگ و میر می‌شوند (۲و۱). در سال ۱۹۲۶ در طی فرآیند واکسیناسیون در لوبک (Lubeck) آلمان، بطور اتفاقی مایعی محتوی باسیل زنده مایکوباکتریوم توبرکلوز (باسیل انسانی) به‌جای واکسن معمولی BCG که تهیه شده از باسیل ضعیف شده مایکوباکتریوم بوویس (باسیل گاوی) است به کودکان تلقیح گردید. نتیجه آن شد که در عده‌ای از کودکان، بیماری سل شدید و مواردی منجر به مرگ شد در حالی که برخی بدون اینکه علامتی از سل نشان دهند از این اتفاق هولناک نجات یافتند (۳). این واقعه نشان می‌دهد که عده کثیری از جمعیت انسان‌ها بطور کاملاً ذاتی در مقابل باسیل سل مقاومت دارند. مطالعات انجام شده روی دو قلوها در رابطه با بیماری سل و فراوانی بیشتر ابتلا به سل را در بین دو قلوهای تک تخمکی به اثبات رسانده است (۶-۴).

این اختلافات فردی در بروز یا عدم بروز بیماری فعال سل شرایط را برای مطالعات فراوانی در خصوص علل زمینه‌ای از قبیل ژنتیک میزبان در ابتلا به این بیماری فراهم کرده است که از این بین می‌توان به مطالعاتی بر روی آنتی ژن لکوسیتی انسانی (HLA)، گیرنده‌ی ویتامین D (VDR)، پروتئین ماکروفاژی مرتبط با مقاومت طبیعی از نوع 1(NRAMP1)، لکتین متصل شونده به مانوز (MBL) و نیز فاکتور نکروز توموری (TNF) اشاره نمود.

قدما پی برده بودند که ویتامین D می‌تواند نقش مهمی در مصونیت افراد در برابر باسیل مایکوباکتریوم توبرکلوز داشته باشد. قبل ار ورود داروهای آنتی‌بیوتیکی در حیطه درمان سل، ویتامین D جهت درمان سل پوستی مورد استفاده قرار می‌گرفت و نتایج رضایت بخشی هم از خود نشان می‌داد (۷). طی یک بررسی در انگلستان، مشاهده گردید که فراوانی کمبود ویتامین D و فراوانی ابتلا به بیماری سل در بین مهاجرین آسیایی این کشور از یک الگو تبعیت می‌کند و این مسئله فرضیه‌ی دخالت کمبود ویتامین D در ابتلا به بیماری سل را تقویت نمود (۸). نباید فراموش نمود که تاثیرات ویتامین D در بدن با واسطه گیرنده‌ی آن (VDR) صورت می‌گیرد. گیرنده‌ای که اخیراً پلی مرفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) متعددی در ژن بیان کننده‌ی آن و نقش زمینه‌سازی این پلی‌مرفیسم‌ها در ابتلای بیشتر به سل نشان داده شده است.

این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی‌مرفیسم‌های ژن بیان کننده‌ی VDR شامل ApaI، BsmI، FokI و TaqI با تمایل به ابتلا به بیماری سل ریوی انجام گردید.

روش بررسی

این مطالعه بصورت یک تحقیق مورد-شاهدی (case-control) و پس از تصویب از سوی شورای علمی و پژوهشی پژوهشکده‌ی سل و بیماری‌های ریوی ایران صورت گرفت. به این ترتیب که نمونه‌های وارد شده به مطالعه بر اساس مثبت یا منفی بودن اسمیر خلط و نیز کشت آن از نظر آلودگی به مایکوباکتریوم توبرکلوز در دو گروه مورد و شاهد دسته‌بندی شدند. شرکت کنندگان گروه مورد (case group) در این تحقیق عبارت بودند از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان دکتر مسیح دانشوری تهران که بیماری سل ایشان هم از طریق بروز و مشاهده‌ی علائم بالینی، هم رادیوگرافی قفسه‌ی سینه و هم نتایج مثبت اسمیر و کشت نمونه‌ی خلط تهیه شده از آنان به اثبات رسیده بود و از سال ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶ به درمانگاه عفونی و یا بخش سل مرکز

Archive of SID
www.SID.ir

تحقیقات سل و مایکوباکتریولوژی واقع در بیمارستان مذکور مراجعه داشتند. نمونه‌های مورد نیاز برای گروه کنترل از بین افرادی که فاقد هرگونه علائم بالینی TB بودند، اما در معرض بیماری سل قرار داشتند، همچون پرسنل آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی و نیز پرستاران و کارکنان بخش‌های در ارتباط با TB، انتخاب شدند. این نوع انتخاب جهت همسان سازی دو گروه در خصوص تماس با بیمار مسلول یا میکروب سل بود. از آنجا که ایران جزء مناطق با بار بیماری متوسط (middle-burden) از نظر سل است و به دلیل واکسیناسیون همگانی ب.ث.ژ، طبق دستورالعمل کشوری مبارزه با سل، استفاده از تست توبرکولین پوستی برای انتخاب گروه شاهد منطقی به نظر نمی‌رسد، این مطالعه به مشاغل افراد در تعیین میزان در معرض قرارگیری به سل بسنده نمود. از تمام افرادی که به‌عنوان جمعیت مورد مطالعه وارد این تحقیق شدند. پس از ارائه‌ی توضیحات شفاهی در خصوص نوع مطالعه، هدف آن و نحوه‌ی اجرای آن، رضایت کتبی گرفته شد. در این مطالعه گروه مورد (cases) شامل ۱۶۴ نفر بیمار مسلول تشخیص داده شده قطعی و گروه شاهد (Control) مشتمل بر ۵۰ نفر سالم و بدون علامت بود که به دلیل شغل خود در ارتباط با مایکوباکتریوم توبرکلوز بودند.

روش انجام کار: نمونه‌ی خون محیطی از هر دو گروه مورد و شاهد پس از اخذ رضایت از ایشان تهیه و به‌همراه EDTA و بصورت غیر آگلوتینه مورد استفاده به شرح ذیل قرارگرفت.

استخراج سلول‌های سفید از خون کامل: هموگلوبین موجود در RBC ها یک عامل ممانعت کننده از واکنش PCR است که جهت کپی و افزایش تعداد قطعات مناسب DNA بکار می‌رود، لذا سعی شد لکوسیت خالص برای استخراج DNA تهیه و مورد استفاده قرار گیرد. این اقدام با اضافه نمودن RBC lysis به خون کامل وریدی که از افراد اخذ شده بود و انجام سانتریفوژ صورت گرفت. جهت کسب نتایج مناسب این اقدام ۳تا۴ بار تکرار گردید. به دلیل عدم نیاز به جداسازی رده‌های مختلف WBC در این مطالعه سلول‌های سفید خون به طور یک‌جا مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA از سلول‌های سفید خون: استخراج DNA از سلول‌های سفید خون با استفاده از پروتکل فنل-کلروفرم انجام گردید. طی این مرحله از بافر SE برای لیز لکوسیت‌ها بهره گرفته شد. اشاره به این نکته لازم است که بافر SE به واسطه‌ی وجود ۳ مولار Nacl و نیم مولار EDTA موجب لیز شدن لکلوسیت‌ها می‌گردد.

از پروتئیناز K برای خارج نمودن پروتئین خون استفاده شد ودمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد که نقطه‌ی دمایی ایده آل (optimal) برای فعالیت مناسب پروتیناز k است فراهم گردید.

در این مطالعه چون بسیاری تحقیقات از محلول TE (Tris EDTA) بعنوان حلال DNA سود بردیم. در آخرین مرحله‌ی استخراج، میکروتیوب به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. (پس از این مرحله محلول حاوی DNA را می‌توان به‌مدت طولانی در دمای یخچال نگهداری نمود).

ژنوتایپینگ VDR: تاکنون چهار جایگاه پلی‌مرفیسم با اهمیت از ژن بیان کننده‌ی گیرنده‌ی ویتامین D شناخته شده است. همانطور که قبلاً ذکر شد، این‌ها با بروز یا پیشگیری از بیماری‌های گوناگونی از جمله بیماری سل در ارتباط هستند. اهمیت این پلی‌مرفیسم‌های چهارگانه و ژنوتیپ‌های متنوع آنها در این مطالعه مد نظر قرار گرفته شد. در این مرحله PCR و متعاقب آن RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) برای شناسایی این پلی‌مرفیسم‌ها انجام شده، پرایمرهایی/ برای هر پلی‌مرفیسم بر اساس مطالعات قبلی و متون مربوط در این زمینه انتخاب شدند. جهت بررسی پلی‌مرفیسم در هر یک از جایگاه‌های FokI و BsmI از یک پرایمر به‌دلیل محل FokI که بر روی اگزون II و BsmI که بر روی اگزون VIII از بازوی بلند کروموزوم ۱۲ می‌باشد، استفاده

Archive of SID
www.SID.ir

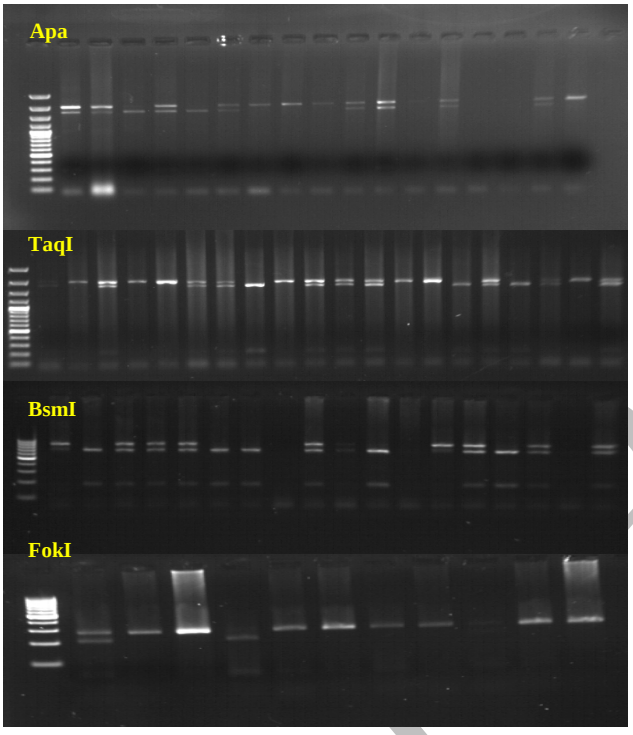
شـــد. از آنجـــا کـــه پلـــی‌مرفیـــسم‌هـــای ApaI و TaqI محل قرارگیری بسیار نزدیک بر روی اگـزون IX کرومـوزوم نـــامبرده دارنـــد، جهـــت انتخـــاب آن دو از یـــک پرایمـــر استفاده شد. جـدول شـماره ۱ انـواع پرایمرهـا و محـصولات آنهـا و پروتکلـی کـه در ایـن مطالعـه جهـت PCR بکـار برده شد را نشان می‌دهد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت هر پلی‌مرفیسم ***و پروتکل PCR***

پلی‌مرفیسم	پرایمر	اندازه محصول (bp)	پروتکل PCR
ApaIو TaqI	5' – GGG ACG ATG AGG GAT GGA CAG AGC - 3' 5'– GGA AAG GGG TTA GGT TTG ACA GGA - 3'	۲۰۰۰	۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه ۳۰ دور شامل: ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه
BsmI	5'–CAA CAA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3 5' – AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG – 3'	۸۲۵	۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه ۳۵ دور شامل: ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه ۶۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه
FokI	5' – AGCTGG CCC TGG CACTGA CTC TGC TCC - 3' 5' – ATGGAA ACA CCT TGC TTC TTC TTC CTC - 3'	۲۶۵	۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد بمدت ۱ دقیقه ۳۰ دور شامل: ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه ۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه

محـــصولات PCR بـــه مـــدت یـــک شـــب در تمـــاس بـا آنـزیم محـدود کننـده (restriction enzyme) قـرار گرفتند. محـصولات حاصـل از عملکـرد آنـزیم‌هـای محـدود کننـــده بـــر روی ژل آگـــاروز ۱/۵ درصـــد بـــرده شـــده و بررســـی گردیـــد و باننـــدهای حاصـــل از الکتروفـــورز بـــا برمید اتیدیوم و تحـت اشـعه UV بررسـی شـدند. نمونـه‌ای از باندهای حاصل برای هر پلـی‌مرفیـسم در شـکل شـماره ۱ نمایان است. بر اساس ژنوتیـپ پلـی‌مرفیـسم موجـود در هـر فـرد کـه قطعـات حاصـل از اثـرات آنـزیم‌هـای محـدود کننـده بـر DNA وزن‌هـای مختلـف را دارا بودنـد، بـا توجـه بـه وزن خـود، باننـد ویـژه‌ای در آگـارز ایجـاد کردنـد که قابل مشاهده و تفکیـک از سـایر ژنوتیـپ‌هـا بـود. تفـسیر نتایج بـر اسـاس ایـن باننـدها و طـول قطعـه‌ی شکـسته شـده صـورت گرفـت. جـدول شـماره ۲ نـشان دهنـده انـدازه‌ی قطعات حاصل از RFLP بود.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR-RFLP

اگر باندهای قابل مشاهده در مورد هر پلی‌مرفیسم با اندازه‌ی قطعات حاصل از PCR-RFLP در جدول شماره ۳ مقایسه گردد، می‌توان به انواع ژنوتیپ‌های موجود پی برد. به عنوان مثال دو ردیف سمت چپ ژل آگارز در ردیف فوقانی (ویژه‌ی Apa) نشان دهنده‌ی هرسه قطعه‌ی شکسته شده پلی‌مرفیسم مذکور بود. ردیف نردبانی سمت چپ به‌عنوان معیار تعیین محل باندها به کار رفت.

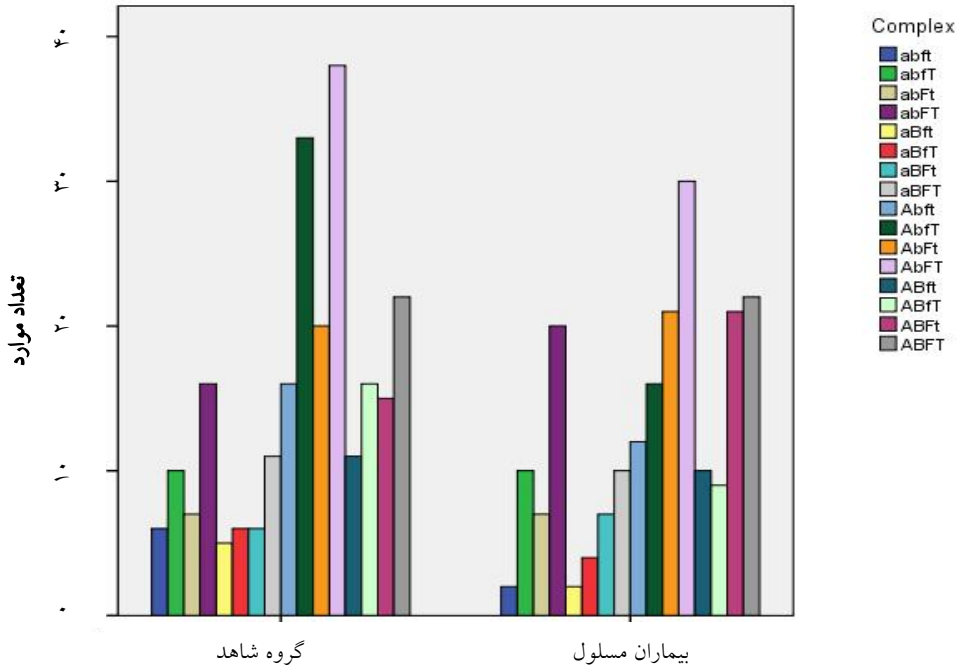
جدول شماره ۲: محصولات **RFLP و اندازه‌ی قطعات شکسته شده**

پلی‌مرفیسم	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	اندازه‌ی محصول (bp)
ApaI	۵۵	AA (۲۰۰۰), Aa (۲۰۰۰,۱۷۰۰,۳۰۰), aa (۱۷۰۰,۳۰۰)
TaqI	۶۵	TT (۲۰۰۰), Tt (۲۰۰۰,۱۸۰۰,۲۰۰), tt (۱۸۰۰,۲۰۰)
BsmI	۶۵	BB (۸۲۵), Bb (۸۲۵,۶۵۰,۱۷۵), bb (۶۵۰,۱۷۵)
FokI	۳۷	FF (۲۶۵), Ff (۲۶۵,۱۹۶,۶۹), ff (۱۹۶,۶۹)

این مطالعه پس از تعیین ژنوتیپ‌های مربوط به هر جایگاه اختصاصی اثر آنزیم‌ها، فراوانی آن‌ها را در هر گروه به‌دست آورد. و پس از مقایسه دو گروه مورد و شاهد از نظر این فراوانی‌ها و تعیین نسبت شانس (odds ratio) و فاصله اطمینان (confidence interval) برای هر ژنوتیپ به توصیف ارتباط بین ژنوتیپ‌های خاص با

Archive of SID
www.SID.ir

بروز یا عدم بروز بیماری سل به‌صورت کاملاً توصیفی (descriptive) پرداخته است.



شکل ۲: فراوانی ژنوتیپ‌های ترکیبی پلی‌مرفیسم‌های VDR به‌صورت هاپلوئید

یافته‌ها

تمام افراد ایرانی مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی در فاصله‌ی زمانی انجام مطالعه که ۲۱۴ نفر بودند، بر اساس تشخیص آزمایشگاهی و رادیوگرافی سینه (CXR)، در صورت مثبت بودن TB در گروه مورد و افراد سالم با توجه به معیارهای ورود در گروه شاهد قرار گرفتند. در نهایت تعداد ۱۶۴ نفر در گروه مورد و ۵۰ نفر در گروه شاهد وارد شدند. دو گروه مورد مطالعه از نظر میانگین سنی اختلاف معنی‌داری نداشتند. در مورد جنسیت افراد باید گفت اختلاف معنی‌داری بین شرکت‌کنندگان دو گروه مورد و شاهد از این حیث وجود نداشت. ۲۲ نفر از گروه شاهد (۴۴ درصد) و ۷۹ نفر از گروه مورد (۴۸/۲ درصد) را خانم‌ها تشکیل می‌دادند و سهم مردان در گروه شاهد ۵۶ درصد (۲۸ نفر) و در گروه مورد ۵۱/۸ درصد (۸۵ نفر) بود. با بررسی مشاهده می‌شود که پلی‌مرفیسم‌های Apa I (P=۰/۴۶) و Taq I (P=۰/۹۷) در بین دو گروه شاهد و مورد از نظر فراوانی ژنوتیپ‌ها تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. ژنوتیپ مغلوب tt در گروه شاهد مشاهده نشد و در گروه مورد ۸ نفر این ژنوتیپ را داشتند. در مورد ۲ پلی‌مرفیسم ویتامین D شامل Bsm I و Fok I، فراوانی ژنوتیپ‌های هاپلوئید و دیپلوئید در بین گروه‌های شاهد و مورد از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نداشتند. به دلیل محدودیت تعداد افراد گروه شاهد، از بین بیماران مسلول ۵۰ نفر به صورت تصادفی انتخاب و در خصوص موارد فوق با گروه شاهد ۵۰ نفره مقایسه گردیدند. هیچ‌گونه اختلاف آماری در موارد فوق یافت نشد. در مقایسه‌ی گروه‌های مذکور از نظر فراوانی همراهی

Archive
www.SID.ir

پلی‌مرفیسم‌ها، ژنوتیپ‌هاپلوئید AbfT و دیپلوئید AAbbFfTT تنها ژنوتیپ‌هایی بودند که از نظر آماری بین دوگروه اختلاف فراوانی معنی‌دار داشتند. نسبت شانس برای AbfT برابر ۰/۲۴ با دامنه اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۰/۱۱ تا ۰/۵۶ و برای AAbbFfTT برابر ۰/۲ با دامنه‌ی ۰/۰۴تا۰/۹ بود. نمودار شماره‌ی ۲ فراوانی ژنوتیپ‌های مذکور را نشان می‌دهد و جدول شماره‌ی ۳ نشان دهنده‌ی موارد دارای اختلاف معنی‌دار به صورت خلاصه می‌باشد.

جدول شماره ۳: فراوانی ژنوتیپ‌های ترکیبی پلی مرفیسم‌های VDR

فراوانی / ژنوتیپ	شاهد	مورد	نسبت شانس	فاصله‌ی اطمینان (٪۹۵)
AbfT	(٪۶۶) ۳۳	(٪۹/۷۶) ۱۶	۰/۲۴۲	۰/۱۰۵-۰/۵۵۸
AAbbFfTT	(٪۱۸) ۹	(٪۱/۲۲) ۲	۰/۱۹۰	۰/۰۳۹-۰/۹۲۹

بحث

بروز سل ریوی در واقع نتیجه‌ی یک تعامل سه جانبه بین پاتوژن مایکوباکتریوم توبرکلوز، انسان و محیط می‌باشد (۹و۴). در این میان دگرگونی‌های ذاتی از قبیل تغییرات ژنوتیپی در انسان و میکروب توانسته است الگوهای جدیدی از انتشار بیماری ایجاد نماید.

نظرات گوناگونی در خصوص دخالت VDR در گرفتاری به سل بیان شده است. مطالعات زیادی ژنوتیپ FokI FF را عاملی زمینه‌ساز برای ابتلا به سل ریوی می‌دانند (۱۱-۹). در برخی مطالعات نیز الل غالب T مربوط به جایگاه پلی‌مرفیسم TaqI در انتقال بیشتر سل ریوی دخیل دانسته شده که البته از نظر آماری قابل دفاع نبوده است (۱۱). در مطالعه‌ی ویلبر، الل غالب F یک عامل حمایت کننده در مقابل سل ریوی به شمار آمده است. این مطالعه، الل مغلوب Taq1 (t) را عاملی برای کیفیت کارایی سیستم ایمنی سلولی بدن می‌داند و معتقد است اثر حمایتی خود در برابر سل را بدین ترتیب اعمال می‌کند (۱۱). بلامی نیز در مطالعه‌ی خود در گامبیا ابراز داشت، ژنوتیپ Taq1 tt در افراد مبتلا به سل کمتر از افراد جامعه وجود دارد (۱۲). از سوی دیگر در مطالعه‌ای که توسط بورن‌من در سه کشور آفریقای غربی انجام شد، هیچ‌گونه ارتباط معنی‌دار آماری بین پلی‌مرفیسم‌های VDR و ابتلا به سل ریوی یافت نشد (۱۳). این تحقیق عکس العمل‌های ژن-ژن و ژن- محیط را یک عامل مهم برای کاهش اثر این پلی‌مرفیسم‌ها چه در سیستم غدد درون ریز و چه ابتلا به سل می‌داند. در مطالعه‌ی متاآنالیز لی‌وایز، تحقیقات انجام شده در خصوص ارتباط VDR با ابتلا به سل ریوی را ضعیف و کوچک خوانده است (۱۴) و البته مشکل برخی مطالعات را مربوط به عدم توجه به سطح سرمی ویتامین D و نیز انتخاب ناصحیح گروه شاهد می‌داند. وی معتقد است برای بدست آوردن نسبت شانس برابر با ۱/۴ با قدرت ۸۰ درصد و با خطای نوع اول ۰/۰۱ نیاز به ۲۰۰۰ نفر در هر کدام از گروه‌های مورد و شاهد می‌باشد. با توجه به یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، هیچگونه ارتباط معنی‌داری بین انواع پلی‌مرفیسم‌های چهارگانه تحت بررسی به طور منفرد با میزان ابتلا به سل یافت نگردید که می‌تواند ناشی از قدرت پایین مطالعه (کمتر از ۳۰ درصد) و نیز عدم توجه به شغل، رژیم غذایی، و بیماری‌های همراه افراد باشد. در بررسی جمعی پلی‌مرفیسم‌های فوق، در دو مورد اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده گردید که احتمالاً به دلیل اثرات تقویت کننده‌ی (synergistic) آنها می‌باشد. این بررسی جمعی در

Archive of SID
www.SID.ir

تحقیقات معدودی صورت گرفته است، لذا یکی از نقاط قوت مطالعه‌ی حاضر است. دو ژنوتیپ AbfT و AAbbFfTT دارای اثر حمایتی در برابر ابتلا به سل تشخیص داده شدند، اما هیچ ژنوتیپی با نقش زمینه‌سازی ابتلا به سل یافت نشد. برای بیان دقیق‌تر و تعمیم یافته‌ها نیاز به مطالعه‌ای با شرکت‌کننده‌های بیشتر و در نتیجه قدرت بالاتر اجتناب ناپذیر است. در نظر داشتن تداخلات و تعاملات عوامل مخدوش‌کننده همچون فعالیت سیستم ایمنی افراد، میزان تماس با بیماری سل و نیز رژیم غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است. ممکن است همراهی پلی‌مرفیسم‌های VDR با سایر فاکتورهای ایمونولوژیک همچون NRAMP1 و سایتوکین‌ها در چنین مطالعاتی تعیین‌کننده باشد. مهمترین و برجسته‌ترین محدودیت این مطالعه کمبود افراد در گروه شاهد بود که با توجه به تحقیقات انجام شده در زمینه‌ی مطالعات با طراحی case-only در زمینه‌های تداخلات ژن- ژن و ژن- محیط تا حدود زیادی قابل توجیه است. چرا که مطالعات مذکور اهمیت حضور گروه شاهد را کمرنگ‌تر از قبل نموده‌اند (۱۶و۱۵). از سوی دیگر تنها مرکز بستری بیماران مسلول در کشور بیمارستان دکتر مسیح دانشوری تهران است. با این پیش زمینه انتخاب قسمتی از گروه شاهد از خارج از مرکز مذکور می‌توانست میزان قرارگیری در معرض سل ریوی را درگروه شاهد از تعادل خارج نماید. لذا این مطالعه به تعداد ۵۰ نفر ولی با میزان خطر یکسان بسنده نمود.

نتیجه‌گیری

دو ژنوتیپ AbfT و AAbbFfTT دارای اثر حمایتی در برابر ابتلا به سل تشخیص داده شدند اما هیچ ژنوتیپی با نقش زمینه‌سازی ابتلا به سل یافت نشد. برای بیان دقیق‌تر و تعمیم یافته‌ها نیاز به مطالعه‌ای با شرکت کننده‌های بیشتر و در نتیجه قدرت بالاتر اجتناب ناپذیر است.

منابع

1- National institute of allergy and infectious diseases (NIAID). According to the WHO, nearly 2 billion people, one-third of the world's population, have TB. 2006. Avaible from: URL: (http://www.niaid.nih. gov/topics/tuberculosis/ research/researchfeatures/history/historical-killer. htm) 26 Oct 2005. retrieved on 3 Oct 2006.

2- WHO. Tuberculosis fact sheet No 104- Global and regional incidence. 2006. Avaible from: URL: http:// www.who.int/mediacentre/ factsheets/fs104/en/index.html.

3- Dubos R, Dubos J. The white plague: Tuberculosis, Man and Society. Little Brown and Co; Boston: 1952.

4- Selvaraj P. Host genetics and tuberculosis susceptibility. *Current science*. 2004; 86: 115-21.

5- Kallmann FJ, Reisner D. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am Rev Tuberc*. 1943; 47: 549-74.

6- Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the prophet survey. *Am Rev Respir Dis*. 1978; 117: 621-4.

7- Dowling GB, Prosser Thomas EW. Treatment of lupus vulgaris with calciferol. *Br J Dermatol*. 1946; 58: 919-22.

Archive of SID
www.SID.ir

8- Strachan DP, Powell KJ, Thaker A, Millard FJ, and Maxwell JD. Vegetarian diet as a risk factor for tuberculosis in immigrant south London Asians. *Thorax.* 1995; 50: 175-80.

9- Liu W, Cao WC, Zhang CY. et al. VDR and NRAMP1 gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8: 428-34.

10- Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhoo XY, Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FOKI variants. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 1691-9.

11- Wilbur AK, Kubatko LS, Hurtado AM, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility M.tuberculosis in native Paraguayans. *Tuberculosis.* 2007; 87: 329-37.

12- Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis.* 1999; 179: 721-4.

13- Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in west Africa: a case-control and family study. *J Infect Dis.* 2004; 190: 1631-41.

14- Lewis SJ, Baker I, Davey Smith G. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. Int J Tuberc Lung Dis. 2005; 9: 1174-7.

15- Gauderman WJ. Sample size requirement for association studies of gene-gene interaction. *Am J Epidemiol.* 2002; 155: 478-84.

16- Gatto NM, Campbell UB, Rundle AG, Ahsan H. Further development of the case-only design for assessing gene-environmental interaction: evaluation of and adjustment for bias. *Int J Epidemiol.* 2004; 33: 1014-24.

Archive of SID

www.SID.ir

The Frequency of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Pulmonary tuberculosis *(TB) Patients and Its Relation with Susceptibility to TB*

Marashian M[1], Parnia P[1], Seif SH[1], Anoosheh S[1]

[1]Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Masih Daneshvari Hospital, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Marashian M, Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Masih Daneshvari Hospital, Tehran, Iran

Email: mehranmarashian@gmail.com

Received: 3 Dec 2008 **Accepted:** 28 Jun 2009

***Background and Objective*:** Many genetic studies on predisposing factors for active tuberculosis have been conducted. Study on human leukocyte antigens (HLA), vitamin D receptor (VDR), NRAMP1, mannose binding lectin (MBL), and tumor necrotizing factor (TNF) are the most studies in this field. This study was planned to identify any relationship between VDR polymorphisms (Apa I, Bsm I, Fok I and Taq I) and susceptibility to TB.

Materials and Methods: This case-control study was performed on blood samples from tuberculosis cases (n=164) and controls (n=50). DNA was extracted from white blood cells and the sequences were amplified by PCR followed by restriction digestion (PCR-RFLP technique) using specific primers and enzymes for each polymorphism. VDR polymorphisms were evaluated for two mentioned groups.

Results: Two genotypes of AbfT and AabbFfTT were the only statistically significant genotypes which had a dfferent frequency between the study and control groups.

Conclusion: Results of this study showed that genotypes of AbfT and AabbFfTT are protective factors against TB in our patients. We could not find any genotype as a predisposing factor for TB in our study group. However, other studies with larger group of samples are needed to find such a relationship.

Keywords: Pulmonary TB, Vitamin D receptor, Polymorphism

Archive of SID

www.SID.ir