



بررسی همراهی پلی مورفیسم rs 1144411 در ژن ویتامین D (VDR) در بیماران مالتیپل اسکلروزیس شهرستان اهواز

*نسیم صادقی

*دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی - سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد
Email: nass30m20@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری عصبی التهابی مزمن خود ایمنی سیستم اعصاب مرکزی است. در بیماری مالتیپل اسکلروزیس سیستم ایمنی به آکسون‌های میلینه در سیستم اعصاب مرکزی حمله می‌کند و میلین را در آکسون‌ها به میزان متفاوتی تخریب می‌کند. این پژوهش با هدف بررسی همراهی پلی مورفیسم rs 1144411 در ژن ویتامین D (VDR) در بیماران مالتیپل اسکلروزیس شهرستان اهواز انجام شده بود.

مواد و روش: در این پژوهش ابتدا از ۷۵ نمونه بیمار مبتلا به MS و ۱۵۰ نمونه کنترل ۴cc خون وریدی گرفته می‌شود سپس استخراج DNA به روش Salting out صورت گرفته و با استفاده از جذب نوری، غلظت و خلوص آن و با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز کیفیت DNA استخراج شده بررسی؛ همچنین چند نمونه‌ی محصول PCR جهت کنترل صحت Tetra-ARMS مورد توالی‌یابی سنگر قرار خواهند گرفت. سپس با تست آماری تی و رگرسیون لجستیک ارتباط این واریانت با خطر ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs 1144411 در ژن ویتامین D (VDR) در بیماران مالتیپل اسکلروزیس و گروه شاهد (p=۰/05) وجود دارد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که پلی مورفیسم rs 1144411 در ژن ویتامین D (VDR) در بیماران مالتیپل اسکلروزیس در این جامعه مورد مطالعه در ارتباط است.

کلیدواژه: پلی مورفیسم rs 1144411، ژن ویتامین D، بیماران مالتیپل اسکلروزیس

۱-مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس^۱ یک بیماری عصبی التهابی مزمن خود ایمنی سیستم اعصاب مرکزی است [1]. در بیماری مالتیپل اسکلروزیس سیستم ایمنی به آکسون‌های میلینه در سیستم اعصاب مرکزی حمله می‌کند و میلین را در آکسون‌ها به میزان متفاوتی تخریب می‌کند [2,3]. این بیماری شایع‌ترین بیماری دمی‌لینه کننده‌ی التهابی سیستم اعصاب مرکزی و فراوان‌ترین عامل ناتوانی عصبی بدون ضرب دیدگی در افراد جوان و میان‌سال می‌باشد. تخمین زده می‌شود ۴۰۰۰۰۰ فرد در ایالات متحده و ۲/۱ میلیون فرد در سراسر دنیا دچار مالتیپل اسکلروزیس هستند [4]. فراوانی این بیماری در زنان بین سنین ۲۰-۴۰ نسبت به مردان دوبرابر است و سفیدپوستان آسیب‌پذیرترند به ویژه آن‌هایی که از اروپای شمالی هستند. تنوع و متغیر بودن ویژگی نشانه‌های بیماری مالتیپل اسکلروزیس است [5]. این بیماری یک بیماری پیچیده است، عوامل مسبب آن به طور کامل شناخته شده نیست و دلایل رخداد متعددی برای آن ذکر می‌شود [6,7].

مطالعات مربوط به ویتامین D بیش از یک قرن است که در حال انجام می‌باشد و بیش از سی سال است که نقش قابل توجه آن در فیزیولوژی و همچنین در بیماری بیان شده است [8]. کمبود این ویتامین با بیماری مالتیپل اسکلروزیس مرتبط است گرچه مکانیسم‌های مولکولی این همراهی به خوبی روشن نشده است. در سال‌های اخیر ارتباط این فرآیند از طریق گیرنده‌ی ویتامین D مورد توجه قرار گرفته است [9].

مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری پیچیده مزمن التهابی و تخریب‌گر عصبی نخاعی و مغزی با عوامل رخداد نامشخص است. می‌توان گفت رخداد این بیماری در نتیجه‌ی ترکیب فاکتورهای محیطی و ژنتیکی حاصل می‌گردد. تفاوت‌های بین فردی نیز در دوره و شدت بیماری دیده می‌شود. مطالعات GWAS واریانت‌های ژنتیکی متعددی که مستعد کننده‌ی مالتیپل اسکلروزیس هستند را ارائه داده است [10].

¹ -Multiple sclerosis(MS)

² - central nervous system(CNS)

³ Nontraumatic



داده‌های حمایت‌کننده‌ی نقش ویتامین D در توسعه مالتیپل اسکلروزیس قابل توجه هستند. شیوع جهانی مالتیپل اسکلروزیس به طور مثبت با عرض جغرافیایی مرتبط است. اشعه‌ی نور UVB فاکتوری است که این ارتباط را برقرار می‌کند و این موضوع در مطالعات ملی فرانسه و ایتالیا مشهود است. جذب ویتامین D به طور معنی‌داری ریسک مالتیپل اسکلروزیس را کاهش می‌دهد و سطح ویتامین D به طور معکوس با ریسک رخداد مالتیپل اسکلروزیس در طول زندگی مرتبط است [11,12]. شواهد عملکردی حاصل مطالعات پژوهشگران در این زمینه نشان می‌دهد ژن‌های ویتامین D و CYP27B1 - ژن کد کننده‌ی ۱۵-هیدروکسیلاز- (که همراهی با مالتیپل اسکلروزیس دارند) در طیف وسیعی از سلول‌های ایمنی شامل آن‌هایی که نقش مرکزی در مالتیپل اسکلروزیس بازی می‌کنند از جمله زیرمجموعه‌های Th1 و Th2، سلول‌های T تنظیمی FOXP3+ و سلول‌های B، بیان می‌شوند. ویتامین D یا به صورت خوراکی یا به صورت سنتز شده در پوست فراهم می‌شود [13,14]. سنتز ویتامین D تحت اثر عرض جغرافیایی، فصل، استفاده از ضد آفتاب و رنگدانه‌های پوست است. با مطالعات CHIP-seq مشخص شده است ۲۷۷۶ عناصر پاسخ‌گو ویتامین D (VDRE) در سراسر ژنوم در سلول‌های B مورد اتصال ویتامین D قرار می‌گیرد. ۷-دی هیدروکلیسترول ساخته شده در سلول‌های پوست، در کبد تبدیل به ۲۵-هیدروکسی ویتامین D3 (۲۵D)، این ترکیب نیز در کلیه به ۱۰۲۵-دی هیدروکسی ویتامین D3 - فرم فعال ویتامین D- می‌گردد. این ترکیب با اتصال به ویتامین D و سپس دایمریزه شدن ویتامین D با RXR به شکل هتروداپمر 1,25D-VDR-RXR وارد هسته می‌شود، جایی که این کمپلکس به VDREها در نواحی پرموتری ژن‌های پاسخ‌گو به ویتامین D متصل می‌شود و بیان ژن‌های پاسخ‌گو به ویتامین D را القا می‌کند. قابل توجه است که لوکوس‌های ژنی همراهی کننده با مالتیپل-اسکلروزیس به طور برجسته‌ای برای محل‌های اتصال ویتامین D غنی هستند [15].

در این مطالعه به بررسی همراهی rs 1144411 واقع در ناحیه‌ی 5-UTR ژن ویتامین D در ۷۵ فرد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس و ۱۵۰ فرد سالم از طریق توالی‌یابی سنگر خواهیم پرداخت. این پلی مورفیسم منجر به تغییر ساختار آمینواسیدی در پروتئین گیرنده ویتامین D می‌گردد. تغییر ACG به ATG باعث ایجاد کدون آغاز جدید و افزودن سه آمینواسید به ابتدای این گیرنده می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

این پژوهش با عنوان بررسی همراهی پلی‌مورفیسم rs 1144411 ژن ویتامین D در بیماران مالتیپل اسکلروزیس شهر اهواز صورت گرفت؛ در این پژوهش ابتدا از ۷۵ نمونه بیمار مبتلا به MS و ۱۵۰ نمونه کنترل ۴cc خون وریدی گرفته می‌شود و در لوله‌ی آزمایش حاوی EDTA جمع آوری می‌گردد. سپس استخراج DNA به روش Salting out صورت گرفته و با استفاده از جذب نوری، غلظت و خلوص آن و با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز کیفیت DNA استخراج شده بررسی می‌گردد؛ و بخشی از ژن ویتامین D که در برگرفته rs 1144411 می‌باشد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای تمییز واریانت مورد نظر با تکنیک Tetra-ARMS PCR تکثیر می‌شود؛ همچنین چند نمونه‌ی محصول PCR جهت کنترل صحت Tetra-ARMS مورد توالی‌یابی سنگر قرار خواهند گرفت. جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شده است سپس با تست آماری تی و رگرسیون لجستیک ارتباط این واریانت با خطر ابتلا به مالتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

جدول ۱: توالی پرایمرها و دماهای مورد استفاده

PCR	چرخه	PCR			توالی	نام آغازگر
		Extensio n	Annealin g	Denatura tion		
۷۸۳	۲۹	۸۴	۵۴	۸۷	CAACCAAGACTAC AAGT ACCGCGTCAGTGA	Bsm I_F
		۱دقیقه	۱دقیقه	۱دقیقه	AACCAGCGGGAA GAGGT CAAGGG	Bsm I_R

۳- نتایج

بررسی مشخصات جمعیت شناختی در دو گروه شاهد و کنترل در جدول (۲) نشان داد که تفاوت موجود در میزان BsmI آن‌ها معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۲: نتایج آزمون مقایسه متغیرهای کمی در گروه بیماران مالتیپل اسکلروزیس و افراد سالم

¹ Ultraviolet B

² Vitamin D responsive elements



سطح معناداری	افراد سالم		بیماران مالتیپل اسکروزیس		متغیرهای کمی
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
0/019	11/182	34/019	12/104	38/960	جنسیت
0/022	4/214	71/74	3/185	69/74	وزن
0/017	۶/۵۸۶	۱۷۲/۲۵۴	۷/۰۹۲	۱۷۳/۶۵۲	قد

نتایج به دست آمده نشان می دهد Bb فراوانترین ژنوتیپ در بیماران و در گروه کنترل می باشد. آزمون رگرسیون نشان داد که بین پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D با استفاده از آزمون BsmI و بیماری مولتیپل اسکروزیس ارتباط معنی داری وجود دارد. ($P < 0.019$)

۴- بحث

عامل بیماری مالتیپل اسکروزیس مبهم است و هیچگونه علت قطعی و درمان موثر وجود ندارد. پاتوفیزیولوژی بیماری پیچیده است تقریباً در تمام صفات پیچیده مولفه های ژنتیکی و محیطی هم به صورت مستقل و هم تعاملی نقش مهمی دارند، که استعداد بیماری، تصادفی بودن و اثرات اپی ژنتیک آن را نمی توان نادیده گرفت. مالتیپل اسکروزیس یک بیماری ارثی در معنای کلاسیک نمی باشد اما به نظر می رسد استعداد ژنتیکی همراه با فاکتورهای محیطی از قبیل: محل، فصل تولد، فاصله تا خط استوا، عفونت در دوران کودکی، کمبود ویتامین D بیماری را القاء می کند. مطالعات خانواده ها و دوقلوها نشان داده است که یک مولفه ژنتیکی قوی علت مالتیپل اسکروزیس را تحت تاثیر قرار می دهد و شیوع این بیماری میان بستگان درجه اول افراد مبتلا ۲۰ تا ۴۰ برابر بیشتر از افراد کل جامعه است. نرخ تطابق بالاتر برای دوقلوهای همسان (۳۴٪-۲۵) نسبت به دوقلوهای ناهمسان (۲-۵٪) وراثت پذیری بالای آن را نشان می دهد. به علت طبیعت خودایمنی این بیماری، تلاش های اولیه برای شناسایی ژن های بیماری مالتیپل اسکروزیس بر روی کمپلکس اصلی سازگاری نسجی (MHC) متمرکز شده است. علاوه بر MHC مناطق ژنتیکی دیگری در استعداد به مالتیپل اسکروزیس دلالت داشته که از مطالعات پیوستگی گسترده ژنوم (GWAS) بدست آمده است. این مطالعات بیش از ۲۰ لوکوس از جمله CD58, IL7R, IL2RA, CLEC16A, TNFRSF1A, IRF, VDR را شامل می شود. ویتامین D برای هموستاز مواد معدنی و استخوان ضرورت دارد. که خصوصیات تنظیم سیستم ایمنی (immunoregulatory) و ضد التهابی (anti-inflammatory) را در بر دارد. ژن گیرنده ویتامین D انسانی بر روی کروموزوم ۱۲ قرار گرفته است. که دارای ۸ ناحیه کدینگ و ۳ ناحیه غیر کدینگ می باشد. گیرنده ویتامین D متعلق به ابرخانواده گیرنده هورمون های نوکلئاز می باشد که رونویسی از ژن های هدف در پاسخ به $1,25(OH)D_3$ را تنظیم می نماید. به نظر می رسد عدم تنظیم متابولیسم ویتامین D با بیماری مالتیپل اسکروزیس و بیماری های دیگری از قبیل دیابت نوع یک، سرطان و پوکی استخوان ارتباط داشته باشد. ویتامین D از طریق رسپتور ویتامین D (VDR) و رسپتور غشایی اتصالی پاسخ سریع به استروئید (MARRS) عمل می کند. برخی از پلی مورفیسم های ژن VDR ممکن است عملکرد و متابولیسم ویتامین D را تغییر داده و نقشی را در بیماری مالتیپل اسکروزیس ایفا کند. اثر این پلی مورفیسم ها به طور قطعی مشخص نشده است. مطالعات مختلفی نقش پلی مورفیسم ژن VDR در جمعیت های قومی مختلف بررسی کرده اند که به علت زمینه ژنتیکی متفاوت، نتایج متناقضی در این رابطه مشاهده شده است.

۵- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بین پلی مورفیسم rs 1144411 در ژن ویتامین D در بیماران مالتیپل اسکروزیس شهرستان اهواز ارتباط وجود دارد و افراد واجد ژنوتیپ های بیشتر در ACG نسبت به افراد دارای ژنوتیپ ATG معرض خطر ابتلا به مالتیپل اسکروزیس می باشند. ویتامین D از طریق تنظیم عملکرد سیستم ایمنولوژیک بدن می تواند نقش مهمی در بروز و یا شدت مالتیپل اسکروزیس داشته باشد. از طرف دیگر فرم فعال ویتامین D در تنظیم بیان بسیاری از ژنهای مهم بدن در مسیرهای گوناگون نقش دارد و ارتباط آن با بسیاری از سرطانها و بیماریهای خودایمن ثابت شده است. کمبود ویتامین D در سیستم ایمنی موجب کاهش سطح Th2 نسبت به سایر سلولهای T بویژه سلولهای دخیل در مسیر التهاب مانند Th1 و Th17 میگردد. این امر در بیماریهای خودایمن مانند MS موجب آسیب بیشتر به میلین اطراف سیستم اعصاب مرکزی میشود. لذا توجه به سطح ویتامین D در افراد جامعه بخصوص مبتلایان به MS ضروری است. جالب توجه است با وجود اینکه ایران در عرض جغرافیایی مناسب از لحاظ دریافت اشعه ماوراء بنفش کافی قرار گرفته است اما کمبود ویتامین D با فرکانس بالا در جامعه و به طور عمده در میان زنان ایرانی مشاهده میشود.



از کسانی که من را در انجام این پژوهش یاری کرده‌اند سپاس و قدردانی می‌کنم.

۶-منابع

- [1] زاهدنسب، حمید (۱۳۹۱). شناسایی وجود احتمالی پلی مورفیسم شایع پروموتور ژن NF- β 1 در بیماران مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس. پایاننامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده پزشکی.
- [2] عباسی نتاج، بابک (۱۳۹۲). بررسی همبستگی پلی مورفیسم در ژن IL2R β (CD25) با بیماران مالتیپل اسکلروزیس جمعیت شرق ایران. پایاننامه کارشناسی ارشد. دانشگاه زابل - دانشکده علوم.
- [3] حسینی، سوسن (۱۳۹۲). بررسی همبستگی پلی مورفیسم پروموتور ژن CYP27B1 در بیماران مالتیپل اسکلروزیس در شرق ایران. پایاننامه کارشناسی ارشد. دانشگاه زابل - دانشکده علوم پایه.
- [4] Munoz-Culla M, Irizar H, Otaegui D. The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates. The application of clinical genetics. 2013;6:63-73.
- [5] Tizaoui K, Kaabachi W, Hamzaoui A, Hamzaoui K. Association between vitamin D receptor polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis of case-control studies. Cell Mol Immunol. 2015;12(2):243-52.
- [6] Ricigliano VA, Handel AE, Sandve GK, Annibali V, Ristori G, Mechelli R, et al. EBNA2 binds to genomic intervals associated with multiple sclerosis and overlaps with vitamin D receptor occupancy. PLoS One. 2011;59(6):881-6.
- [7] Munoz-Culla M, Irizar H, Otaegui D. The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates. The application of clinical genetics. 2013;6:63-73
- [8] اکبریان، فاطمه (۱۳۹۲) بررسی پلی مورفیسم - C >T1514 ژن TBX21 در بیماران ایرانی مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس. پایاننامه کارشناسی ارشد. دانشگاه گیلان - دانشکده علوم پایه.
- [9] موسوی، مریم (۱۳۹۲) بررسی پلی مورفیسم ژن رسپتور ویتامین D (VDR) در بیماران مبتلا به MS در شهر زاهدان. پایاننامه کارشناسی ارشد. دانشگاه سیستان و بلوچستان - دانشکده علوم پایه.
- [10] رجبی مقدم، مریم (۱۳۹۲) بررسی پلی مورفیسم های ژن اینترلوکین ۳۳ و خطر مالتیپل اسکلروزیس. پایاننامه کارشناسی ارشد. دانشگاه سیستان و بلوچستان - دانشکده علوم پایه.
- [11] اکبری، سمیرا (۱۳۹۳). اثر بخشی درمان راه حل - محور به شیوه گروهی بر شادکامی و کیفیت زندگی زنان مبتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس. پایاننامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید چمران اهواز - دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی.
- [12] Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R. Association study on two vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D metabolites in multiple sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 2009;1173:515-20.
- [13] Sioka C, Papakonstantinou S, Markoula S, Gkartzou F, Georgiou A, Georgiou I, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis patients in northwest Greece. J Negat Results Biomed. 2011;10:3.
- [14] Agliardi C, Guerini FR, Saresella M, Caputo D, Leone MA, Zanzottera M, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene SNPs influence VDR expression and modulate protection from multiple sclerosis in HLA-DRB1*15-positive individuals. Brain Behav Immun. 2011;25(7):1460-7.
- [15] Gandini S, Gnagnarella P, Serrano D, Pasquali E, Raimondi S. Vitamin D receptor polymorphisms and cancer. Adv Exp Med Biol. 2014;810:69-105.