

## **Vitamin D receptor gene polymorphism in patients with multiple sclerosis in Mar kazi Province**

Shojapuor M(M.Sc)<sup>1</sup> Mosayebi G(PhD)<sup>2</sup>, Ghasami K(M.D)<sup>3</sup>, Ghazavi A(M.Sc)<sup>4</sup>, Sadeghi A(PhD)<sup>5\*</sup>

1-Medical and Molecular Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2-Medical and Molecular Research Center, Department of immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Internal Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

4-Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

5- Medical and Molecular Research Center, Department of Biochemistry and Genetics, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 22 Aug 2011, Accepted: 8 Nov 2011

### **Abstract**

**Background:** Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease which demyelinates the central nervous system. Vitamin D, is a potential environmental factor which influences this disease. The majority of the biological activities of the polymorphism forms of vitamin D are done through its receptor gene (VDRG). The aim of this study was to examine the relationship between BsmI polymorphisms in VDRG and the incidence of MS.

**Materials and Methods:** In this case-control study, the BsmI polymorphism in the VDRG was studied in 80 Iranian MS patients and 50 healthy controls of the same genetic background and age through polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method

**Results:** There was a significant difference in the frequency of BsmI VDRG polymorphism genotypes between MS patients and controls (P=0.023).

**Conclusion:** This study indicated that the VDRG BsmI polymorphism is associated with MS in this population.

**Keywords::** Gene polymorphism, Multiple sclerosis, Vitamin D receptor

\*Corresponding author:

Address: Medical and Molecular Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: dr.sadeghi@arakmu.ac.ir

## بررسی پلی مورفیسم جایگاه BsmI در ژن رسپتور ویتامین D در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروزیس در استان مرکزی

مانا شجاعپور<sup>1</sup>، قاسم مسیبی<sup>2</sup>، کیوان قسامی<sup>3</sup>، علی قضاوی<sup>4</sup>، عبدالرحیم صادقی<sup>5</sup>\*

- 1- کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 2- دانشیار، دکتری ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 3- استادیار، متخصص نورولوژی، گروه نورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 4- دانشجوی دکتری ایمنی شناسی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 5- استادیار، دکتری ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/6/1 تاریخ پذیرش: 90/8/18

### چکیده

**زمینه و هدف:** مولتیپل اسکروزیس یک بیماری خود ایمن است که باعث اختلال در سیستم عصبی مرکزی می‌گردد. یک عامل محیطی بالقوه که این بیماری را متاثر می‌کند، ویتامین D است. اکثر فعالیت‌های بیولوژیکی فرم فعال ویتامین D از طریق گیرنده آن اعمال می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم BsmI در گیرنده ویتامین D و بروز بیماری مولتیپل اسکروزیس می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد شاهدهی، پلی مورفیسم جایگاه BsmI، در ژن گیرنده ویتامین D در 80 بیمار مبتلا به مولتیپل اسکروزیس و 50 فرد سالم هم سن و هم نژاد به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم BsmI در ژن گیرنده ویتامین D بین بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروزیس و گروه شاهد ( $p=0/023$ ) وجود دارد.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که پلی مورفیسم BsmI در ژن گیرنده ویتامین D با بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروزیس در این جامعه مورد مطالعه در ارتباط است.

**واژگان کلیدی:** پلی مورفیسم ژنی، مولتیپل اسکروزیس، گیرنده ویتامین D

\*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک

Email: dr.sadeghi@arakmu.ac.ir

## مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS; Multiple Sclerosis) یک بیماری خودایمن است که باعث اختلال در سیستم عصبی مرکزی می‌گردد. در این بیماری سیستم ایمنی باعث تخریب میلین رشته‌های عصبی می‌گردد (1). اتیولوژی کامل این بیماری مشخص نیست ولی عامل محیطی و ژنتیکی در استعداد ابتلا به بیماری نقش دارند (2). یک عامل محیطی بالقوه که این بیماری را متاثر می‌کند، ویتامین D است. کمبود ویتامین D در مبتلایان MS به اثبات رسیده است (3). از طرفی اکثر فعالیت‌های بیولوژیکی فرم فعال ویتامین D از طریق گیرنده آن اعمال می‌شود. این گیرنده روی انواع مختلفی از سلول‌های عصبی و هم‌چنین سلول‌های ایمنی مثل منوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها بیان می‌شود. فعال شدن این گیرنده باعث تغییر در فرآیند رونویسی، تکثیر و تمایز می‌گردد (4). ژن گیرنده ویتامین D انسانی، بر روی کروموزوم 12 قرار گرفته است که دارای 8 ناحیه کدینگ و 3 ناحیه غیر کدینگ می‌باشد (5). گیرنده ویتامین D متعلق به ابر خانواده گیرنده هورمون‌های نوکلئاز می‌باشد که رونویسی از ژن‌های هدف در پاسخ به  $1,25(OH)2D3$  را تنظیم می‌نماید (6). 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 به طور قطعی مشخص نشده است (7). مطالعات مختلفی نقش پلی مورفیسم ژن VDR در جمعیت‌های قومی مختلفی بررسی کرده‌اند و نتایج متناقضی در این رابطه مشاهده شده است. در یک مطالعه در ژاپن ارتباط بین پلی مورفیسم جایگاه BsmI و بیماری MS گزارش گردید (8). در استرالیا در یک مطالعه مورد شاهده، تفاوت قابل توجهی در توزیع ژنوتیپ TaqI در بیماران MS مشاهده گردید (9). با این وجود در سایر مطالعات تفاوتی در پلی مورفیسم ژن VDR و گروه کنترل مشاهده نشده است (10-12). به دلیل مطالعات محدود و مغایر در خصوص پلی مورفیسم ژن گیرنده ویتامین D و عدم وجود چنین مطالعه‌ای در این استان مرکزی ارتباط این بیماری با پلی مورفیسم جایگاه تشخیصی BsmI در این ژن صورت گرفت. این جایگاه جزء پلی مورفیسم‌های تک

نوکلئوتیدی (SNP) می‌باشد که در اینترون 8 ژن VDR قرار دارد (9).

## مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی است. 80 بیمار مبتلا به MS و 50 فرد سالم و فاقد بیماری‌های نورولوژیک شناخته شده به تایید متخصص مغز و اعصاب وارد مطالعه شدند. افراد وارد مطالعه تا حد امکان از نظر سن، جنس و سطح اقتصادی مطابقت داده شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت DNG-plus از شرکت سیناکلون، ایران و بر اساس دستورالعمل کیت انجام گردید.

آزمون PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی در حجم نهایی 25 میکرولیتر محتوی 2) میکرولیتر Mgcl2، 2/5 میکرولیتر بافر PCR، 0/5 میکرولیتر dNTPs، 17/3 میکرولیتر آب مقطر، 1 میکرولیتر پرایمر رفت، 1 میکرولیتر پرایمر برگشت، 0/2 میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (تهیه شد و نهایتاً به هر میکروتیوپ یک میکرولیتر DNA الگو اضافه گردید. توالی پرایمر مورد استفاده بر طبق مطالعات سایر محققین انتخاب گردید (13) و شرایط تکثیر این قطعه ژنی تنظیم گردید (جدول 1).

پس از تایید اندازه محصول PCR بر روی ژل آگاروز 1 درصد برای باقیمانده محصول آزمایش RFLP انجام شد. بدین ترتیب که یک واحد از آنزیم محدود کننده را در 2 میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم با 7 میکرولیتر آب مقطر استریل و 10 میکرولیتر محصول PCR مخلوط کرده و در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 16 ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. سپس الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش هضم با استفاده از ژل پلی اکریل آمید 8 درصد انجام شد. در مرحله بعد از روی الگوی هضم آنزیمی ژنوتیپ‌ها تعیین شدند. آلل B دارای یک قطعه با طول 825 جفت باز و آلل b دارای دو قطعه با طول‌های 650 و 175 می‌باشد. بنابراین جایگاه هضم آنزیم BsmI در آلل B از دست رفته است.

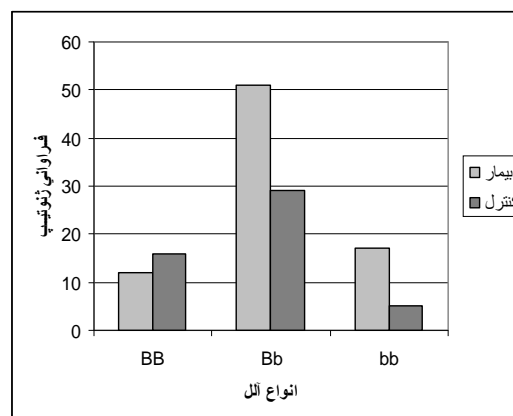
جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه 11/5 استفاده شد. از طرفی به منظور بررسی ارتباط بیماری با پلی مورفیسم ژن گیرنده ویتامین D از آزمون رگرسیون لجستیک استفاده گردید.

جدول 1. توالی پرایمرها و دماهای مورد استفاده

PCR product (bp)	Cycle	PCR			Sequence	Primer name
		Extension	Annealing	Denaturation		
825	35	72	68	94	CAACCAAGACTACAAGT	Bsm I_F
		1 دقیقه	1 دقیقه	1 دقیقه	ACCGCGTCAGTGA	Bsm I_R
					AACCAGCGGGAAGAGGT	
					CAAGGG	

## نتایج

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد Bb فراوانترین ژنوتیپ در بیماران و در گروه کنترل می‌باشد (نمودار 1). آزمون رگرسیون نشان داد که بین پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D با استفاده از آنزیم BsmI و بیماری مولتیپل اسکلروزیس ارتباط معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0/023$ ).



نمودار 1. مقایسه درصد فراوانی ژنوتیپ‌های گیرنده ویتامین D در جایگاه آنزیم BsmI در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد کنترل

## بحث

در مطالعات بالینی، اثرات حفاظتی در ابتلا به مولتیپل اسکلروزیس، از طریق افزایش سطوح  $1,25(OH)2D3$  توضیح داده شده است. همچنین در مطالعه قبلی ما و دیگران بر روی مدل حیوانی MS (EAE) مشخص شد که شدت بیماری با وضعیت ویتامین D آنها مرتبط است. تجویز ویتامین D به موش‌ها از آغاز و پیشرفت EAE در آنها جلوگیری می‌کند و بر عکس آن کمبود ویتامین D باعث افزایش حساسیت آنها به EAE

می‌شود (14-17). اگرچه مطالعات انجام شده، بیماری MS را با ویتامین D در مدل EAE مرتبط می‌داند ولی نمی‌توان آن را به معنای ارتباط ویتامین D با MS در انسان در نظر گرفت. با توجه به این که در بیماری MS، سیستم ایمنی از مسیر طبیعی خود خارج شده و به بافت‌های بدن حمله می‌کند، ویتامین D احتمالاً با تاثیر بر این سیستم باعث تعدیل بیماری می‌شود (18). در این مطالعه، ارتباط بین پلی مورفیسم BsmI و بیماری MS، همچنین ارتباط‌ها پلوتیپ‌های BsmI و بیماری MS را بررسی شد. در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم VDR-BsmI با بروز بیماری MS مشاهده گردید.

از طرفی مطالعات متعددی در خصوص بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D و بیماری MS صورت گرفته است. در مطالعه انجام شده بر روی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس در ژاپن نشان داده شد که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم BsmI و بیماری وجود دارد (8). همچنین بین پلی مورفیسم جایگاه ApaI در جمعیت ژاپنی و استرالیایی و TaqI در جمعیت استرالیایی ارتباط معنی‌داری با بیماری مشاهده شد (8، 9). پارتیج و همکاران نشان دادند که یک گرایش در پلی مورفیسم FokI و بیماران مبتلا به MS وجود دارد (19) نتایج حاصل از این مطالعات با مطالعه ما هم‌خوانی داشت.

این ارتباط در سایر مطالعات انجام شده در مناطق مختلف جغرافیایی مشاهده نشد. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در انگلستان انجام شد بین پلی مورفیسم TaqI و بیماری مولتیپل اسکلروزیس ارتباطی مشاهده نشد (20). در مطالعه‌ای که در کانادا بر روی والدین مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس

supplementation. Journal of neuroimmunology. 2003; 134(1):128-32.

5. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, van Leeuwen H, Pols HAP. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2004; 89: 187-93.

6. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Nature. 1994; 367(6460):284-7.

7. Niksresht A, Dadkhah B, Kamali Sarvestani E. The Association of Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism with Multiple Sclerosis in Iranian Patients. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2009; 16(2): 116-23.

8. 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. Journal of the neurological sciences. 1999;166(1):47-52.

9. Tajouri L, Ovcarić 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. Journal of neurogenetics. 2005;19(1):25-38.

10. Dickinson J, Perera D, van der Mei A, Ponsonby A, Polanowski A, Thomson R, et al. Past environmental sun exposure and risk of multiple sclerosis: a role for the Cdx-2 Vitamin D receptor variant in this interaction. Multiple Sclerosis. 2009;15(5):563-70.

11. Rombouts SARB, Damoiseaux JS, Goekoop R, Barkhof F, Scheltens P, Smith SM, et al. Model-free group analysis shows altered BOLD FMRI networks in dementia. Human brain mapping. 2009; 30(1):256-66.

12. Steckley J, Dyment D, Sadovnick A, Risch N, Hayes C, Ebers G. Genetic analysis of vitamin D related genes in Canadian multiple sclerosis patients. Neurology. 2000;54(3):729-32.

انجام شد، انتقال ترجیحی ژن‌های TaqI و ApaI از والدین به فرزندان مشاهده نگردید(21). هم‌چنین در مطالعه‌ای در جنوب ایران توسط نیک سرشت و همکاران ارتباط معنی‌داری یافت نگردید(7). با توجه به اختلاف مشاهده در مطالعات مذکور به خصوص در جمعیت ایرانی به منظور پی‌بردن به علت این امر نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه هم‌چنین بررسی جمعیت‌ها و قومیت‌های مختلف ایرانی می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر بررسی نقش پلی مورفیسم ژن VDR در جمعیت‌های مختلف، هم‌چنین توزیع پلی‌مورفیسم‌های دیگر از جمله ApaI, TaqI و FokI به منظور تایید حضور این ژن‌ها در استعداد ابتلا به MS و دست یافتن به استراتژی مناسب درمان ضروری می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش، حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی شماره 389 می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکاری‌هایی که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

### منابع

1. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. Immunology today. 1995;16(1):34-8.
2. Granieri E, Casetta I. Common childhood and adolescent infections and multiple sclerosis. Neurology. 1997;49(2 Suppl 2):S42-S54.
3. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet. 2002; 359(9313): 1221-31.
4. Mahon B, Gordon S, Cruz J, Cosman F, Cantorna M. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D

13. Rezende VB, Barbosa Jr F, Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 384(1-2): 155-9.
14. Van Etten E, Branisteanu D, Overbergh L, Bouillon R, Verstuyf A, Mathieu C. Combination of a 1, 25-dihydroxyvitamin D3 analog and a bisphosphonate prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and preserves bone. *Bone*. 2003;32(4):397-404.
15. Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero-Menei CN. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 leads to early effects within the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2003;105(5):438-48.
16. Lemire JM, Archer DC. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 87(3): 1103-7.
17. Ghasami K, Ghazavi A, Jand Y, Payani MA, Khazaei M, Mosayebi G. The effect of vitamin D3 on nitric oxide levels in patients with multiple sclerosis. *Arak Medical University Journal*. 2010;13(2):119-24.[Persian]
18. Mosayebi G, Ghazavi A, Ghasami K, Jand Y, Kokhaei P. Therapeutic effect of vitamin D3 in multiple sclerosis patients. *Immunological investigations*. 2011;40(6):627-39.
19. Partridge J, Weatherby S, Woolmore J, Highland D, Fryer A, Mann C, et al. Susceptibility and outcome in MS. *Neurology*. 2004; 62(12): 2323-5.
20. Yeo TW, Maranian M, Singlehurst S, Gray J, Compston A, Sawcer S. Four single nucleotide polymorphisms from the vitamin D receptor gene in UK multiple sclerosis. *Journal of neurology*. 2004;251(6):753-4.
21. Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2008; 88(2): 441-7.