

بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن رسپتور ویتامین D با بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس پاسخگو و غیر پاسخگو به درمان با اینترفرون بتا

زینب فتاحی^۱، مرتضی صمدی^{۲*}، ریحانه‌السادات صندوق‌ساز^۱، رضا نجفی‌پور^۳، صفرعلی علیزاده^۴

مقاله پژوهشی

مقدمه: هدف این مطالعه جستجوی ارتباط بین ۴ پلی مورفیسم *ApaIrs797532*, *TaqIrs731236*, *FokIrs10735810* و *BsmIrs1544410* واقع در رسپتور ویتامین D در بیماران MS پاسخگو و غیر پاسخگو به درمان با اینترفرون بتا و هموار کردن راه جهت تجویز صحیح و سریع داروی مناسب، هم‌چنین کاهش زمان، هزینه و عدم موفقیت در درمان است. **روش بررسی:** نوع مطالعه مشاهده‌ای و روش مطالعه به صورت مورد - شاهدی است. از ۲۰۰ بیمار MS که تحت درمان با داروی اینترفرون بودند (۱۰۰ نفر پاسخگو و ۱۰۰ نفر غیر پاسخگو به درمان) نمونه خون گرفته شد و با استفاده از تکنیک PCR-RFLP نمونه‌ها تحت هضم آنزیمی آنزیم‌های محدود کننده *TaqI*, *FokI*, *ApaI* و *BsmI* قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS version 16، SNP Analyzer و Prism و آزمون‌های χ^2 و رگرسیون لجستیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: اختلاف معنی‌داری در فراوانی‌های ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم‌های *ApaI* ($p=0/68$)، *BsmI* ($p=0/65$)، *FokI* ($p=0/57$) و *TaqI* ($p=0/50$) در جمعیت افراد بیمار در بین دو گروه پاسخگو و غیر پاسخگو به درمان مشاهده نگردید. **نتیجه‌گیری:** طبق مشاهدات بین پلی مورفیسم‌های *TaqI*, *FokI*, *ApaI* و *BsmI* واقع در ژن رسپتور ویتامین D و پاسخ یا عدم پاسخ به درمان با اینترفرون، ارتباطی وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، رسپتور ویتامین D، اینترفرون بتا

ارجاع: فتاحی زینب، صمدی مرتضی، صندوق‌ساز ریحانه‌السادات، نجفی‌پور رضا، علیزاده صفرعلی. بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن رسپتور ویتامین D با بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس پاسخگو و غیر پاسخگو به درمان با اینترفرون بتا. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۲؛ ۳۱ (۳): ۶۴۹۴-۶۵۰۴.

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، ایران.

۳- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ایران.

۴- مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۶۹۰۱۵۰۵، پست الکترونیکی: Samadi.for@gmail.com، صندوق پستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۴۹

دنیا بر روی پلی‌مورفیسم‌های رسپتور ویتامین D و ارتباط آن‌ها با MS انجام‌گرفته است که نتایج آن‌ها متفاوت و بحث‌برانگیز است (۱۰). از جمله این مطالعات، مطالعاتی است که بر روی جمعیت‌های ژاپن (۱۱)، استرالیا (۱۲)، اسلواکی (۱۳)، کویت (۱۴)، تونس (۱۵)، ترکیه (۱۶) و هم‌چنین ایران (۱۷،۱۸) انجام شده است. باتوجه‌به اینکه این ژن می‌تواند نقش بسیار مهمی در بیماری MS ایجاد نماید و موردتوجه محققین بسیاری در سرتاسر جهان واقع شده و نتایج در جمعیت‌های مختلف دنیا بسیار متنوع گزارش شده است، هم‌چنین نتیجه‌بخشی متفاوت درمان با داروی اینترفرون بتا در بیماران، هدف این مطالعه جستجوی ارتباط بین ۴ پلی‌مورفیسم FokI, BsmI, TaqI و ApaI واقع در رسپتور ویتامین D در بیماران MS پاسخگو و غیرپاسخگو به درمان با اینترفرون بتا و هموارکردن راه جهت تجویز صحیح و سریع داروی مناسب به افراد هم‌چنین کاهش زمان، هزینه و عدم موفقیت در درمان است.

روش بررسی

نوع مطالعه مشاهده‌ای و روش مطالعه به‌صورت مورد - شاهدهی است.

جمعیت مورد مطالعه: در این پژوهش ۲۰۰ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس که توسط متخصص نورولوژی بر اساس شاخص مک‌دونالد بیماری‌شان و نوع آن تأیید شده بود، با رضایت شخصی خود شرکت کردند. (کد اخلاق: IR.SSU.MEDICINE.REC.1396.149) ۱۰۰ فرد با متوسط سنی $۶/۸۰ \pm ۳۶/۳۹$ گروه پاسخ‌دهنده به درمان و ۱۰۰ فرد با متوسط سنی $۷/۲۵ \pm ۳۵/۸۴$ گروه غیر پاسخ‌دهنده به درمان را تشکیل می‌دهند. آزمون آماری نشان داد که دو گروه از لحاظ سنی تفاوت معنی‌داری از خود نشان نمی‌دهند. ($p=0/۵۸$). بر اساس گزارشات موجود در مطالعات پیشین، بیمارانی که یک حمله یا بیشتر و افزایش ۱ واحد EDSS در هر ۶ ماه داشتند، در گروه غیر پاسخ‌دهنده به درمان (Non-responder, NR) و بیمارانی که کمتر از یک حمله یا کمتر از ۱ واحد افزایش EDSS در هر ۶ ماه داشتند، در گروه پاسخ‌دهنده

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری التهابی است که در آن غلاف‌های میلین سلول‌های عصبی در مغز و نخاع آسیب می‌بیند (۱،۲). شیوع مالتیپل اسکلروزیس در ایران در سال‌های اخیر روبه‌افزایش گزارش شده است (۳). اینترفرون بتا یکی از داروهای اصلی و سودمند در درمان بیماری MS می‌باشد؛ اما این دارو در ۲۰ تا ۵۰ درصد از موارد نتیجه‌ای نشان نداده است. مشخص کردن اینکه بیمار به این دارو جواب می‌دهد یا نه قبل از تجویز بسیار سودمند خواهد بود (۴). متأسفانه مشاهده پاسخ بیمار به اینترفرون بتا، به پیگیری علائم بیمار به مدت ۱ تا ۲ سال نیاز دارد و این در بیماران غیرپاسخگو به این معناست که بیمار به مدت طولانی بدون درمان مفید باقی می‌ماند که فارغ از بی‌تأثیربودن درمان، هزینه‌های زیادی به بیمار تحمیل خواهد شد. بسیاری از تفاوت‌های پاسخ به درمان به علت تنوع ژنتیکی بین افراد است. این جمله به این معنا است که افراد نیازمند دوز متفاوتی از یک دارو هستند و در موارد دیگر، داروهایی که برای یک فرد مؤثر و ایمن است، ممکن است برای دیگری کشنده باشد (۵،۶)؛ بنابراین یافتن بیومارکرهایی جهت پیش‌بینی پاسخ به درمان در کنار یافته‌های بالینی و رادیولوژیکی برای مشخص کردن درمان صحیح و به‌موقع بسیار مفید خواهد بود. مطالعات زیادی نشان داده که سطح سرمی ویتامین D در بیماران MS به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای پایین بوده است (۷). ویتامین D را به‌عنوان یک فاکتور محیطی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای مسبب بروز بیماری‌های نورودژنراتیو مثل MS می‌دانند. فرم فعال ویتامین D عملکرد خود را از طریق اتصال به رسپتور ویتامین D هسته‌ای اعمال می‌کند؛ بنابراین نقص در این ژن باعث اختلال در عملکرد ویتامین D و در ادامه افزایش خطر بیماری‌های اتو ایمن مثل MS می‌شود. پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند عملکرد رسپتور ویتامین D را تغییر دهند. ۴ پلی‌مورفیسم در رسپتور ویتامین D را مرتبط با بیماری MS دانسته‌اند: FokIrs10735810, BsmIrs1544410, TaqI rs73123 و ApaIrs7975232. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری در نقاط مختلف

ترموسایکلر ABI (دستگاه Veriti 96 Well Thermal Cycle) شرکت Applied Biosystems (ABI) ساخت USA) در سه مرحله دمایی پشت سرهم، صورت گرفت. این عمل برای هر کدام از آنزیم‌ها به صورت جداگانه انجام شد و مواد مورد استفاده در میکس اپتیمایز شدند، سپس برای هر نمونه چهار واریانت PCR گذاشته شد. جهت بررسی اندازه قطعات تکثیر شده و اختصاصی بودن محصولات، الکتروفورز آن‌ها روی ژل آگارز انجام شد و محصولات بعد از اتمام واکنش PCR، روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردیدند. سپس از تکنیک PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) که یکی از روش‌های استاندارد در شناسایی پلی مورفیسم‌ها است، استفاده شد. برای این منظور محصول PCR را با آنزیم‌های محدودکننده طبق دستور شرکت سازنده با هم مخلوط کرده و با توجه به زمان برش آنزیم که در دستورالعمل آمده بهترین دما را برای برش انتخاب کردیم. بعد از زمان انکوباسیون محصول روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و با استفاده از الگوی به دست آمده از برش آنزیم‌های محدودگر، پلی مورفیسم‌های مختلف ژن‌های گیرنده ویتامین D مورد مطالعه در هر بیمار تفکیک و عکس ژل‌های الکتروفورز شده با دستگاه Gel documentation تهیه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده گردید، هم‌چنین دو گروه مورد مطالعه (پاسخ‌دهنده و غیر پاسخ‌دهنده به دارو) از نظر متغیر سن که تنها متغیر پارامتریک این مطالعه بود و جنس (متغیر ناپارامتریک) مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی اختلاف معنی‌دار ژنوتیپ‌ها در بین دو گروه از آزمون ناپارامتریک مربع کای استفاده گردید. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16، با استفاده از روش آماری مربع کا X^2 و با در نظر گرفتن مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری و محاسبه نسبت خطر نسبی (OR) با فاصله اطمینان (CI) ۹۵ درصد از طریق روش آماری رگرسیون لجستیک مورد آنالیز قرار گرفتند. قابل ذکر است به منظور تجزیه و تحلیل فراوانی

به درمان (Responder, R) قرار گرفتند. بیماران همگی از نوع RRMS (relapsing-remitting MS) بوده و از داروهای بتا اینترفرون استفاده می‌کردند که هر یک حداقل در دو بازه زمانی ۴ ماهه توسط متخصص از نظر وضعیت پلاک‌ها در MRI، وضعیت پیشرفت ناتوانی و مارکرهای خونی بررسی شده‌اند.

معیارهای ورود به مطالعه: ابتلا به بیماری MS - مصرف

داروهای بتا اینترفرون

معیارهای خروج از مطالعه: ابتلا به سایر بیماری‌های

اتوایمیون و بیماری‌های التهابی - مصرف سایر داروها

متغیرهای همسان‌سازی شده: سن - جنس

مراحل انجام مطالعه: از هر یک از افراد پاسخ‌دهنده و غیر

پاسخ‌دهنده به درمان، پنج میلی‌لیتر خون محیطی با ضدانقاد

EDTA گرفته شد. با استفاده از کیت استخراج ستونی DNA

ژنومی شرکت MBST ساخت ایران، DNA نمونه‌های خون

استخراج شد. روش خالص‌سازی DNA در این کیت بر مبنای

اتصال اختصاصی اسیدهای نوکلئیک به ستون شامل سیلیکا در

حضور نمک‌های کاتوتروپیک است. مواد غیر اسید نوکلئیک که

توانایی اتصال به غشای ستون را داشتند طی مراحل مختلف

شستشو و با سانتریفیوژ کردن از ستون شسته شدند. سپس

DNA متصل به ستون با افزودن بافر حل‌کننده (Elution

Buffer)، حل و جدا شده و پس از بررسی خلوص و کیفیت،

تا زمان استفاده جهت انجام مراحل بعدی فریز گردید. در

مرحله بعد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، به وسیله دو

آغازگر (پرایمر) الیگونوکلئوتیدی اختصاصی و مناسب انجام شد.

پرایمرهای رفت و برگشت مورد استفاده، با نرم‌افزار Beacon

طراحی شده و سپس صحت اتصال پرایمرها به توالی‌های

مخصوص به خود و عدم اتصال آن‌ها به توالی‌های غیر مرتبط و

مداخله‌گر در پایگاه NCBI nucleotide BLAST مورد تأیید

قرار گرفت و جهت سنتز به شرکت تکاپو زیست سفارش داده

شد. پرایمرها به صورت لیوفیلیزه از شرکت تحویل و طبق

پروتکل شرکت سازنده با آب مقطر فاقد DNase/RNase به

غلظت ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر رسانده شد. تکثیر به کمک

آنزیم Taq DNA polymerase و dNTPs توسط دستگاه

جدول ۵ مشاهده می‌شود نسبت شانس حدود ۱ بوده و ژنوتیپ‌های مختلف شانس حدوداً یکسانی در پاسخ و عدم پاسخ به درمان دارند.

بررسی آماری ژنوتیپ پلی‌مورفیسم BsmI: انجام تست آماری مربع کای - اسکوار حدود اطمینان $p=0/65$ را نشان داد و مشخص شد، رابطه آماری معنی‌داری بین سه ژنوتیپ مختلف و پاسخ و عدم پاسخ به درمان بیماری وجود ندارد. در مطالعه حاضر، آنالیزهای آماری پلی‌مورفیسم BsmI هیچ افزایش خطر چشمگیری در بیماران با ژنوتیپ GG در مقایسه با گروه کنترل نشان نمی‌دهد ($OR=0/88$ ، $CI=0/95$ ، $1/24 - 0/62$). هم‌چنین با آنالیز نتایج فراوانی آ‌ل‌ها مشخص گردید در این پلی‌مورفیسم نیز تفاوت معناداری بین ال‌های دو گروه پاسخ‌دهنده و غیر پاسخ‌دهنده وجود ندارد. همان‌طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود نسبت شانس حدود ۱ بوده و ژنوتیپ‌های مختلف شانس حدوداً یکسانی در پاسخ و عدم پاسخ به درمان دارند.

بررسی آماری ژنوتیپ پلی‌مورفیسم FokI: انجام تست آماری مربع کای - اسکوار حدود اطمینان $p=0/57$ را نشان داد و مشخص شد، رابطه آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های حاصل و بیماری وجود ندارد هم‌چنین آنالیزهای آماری پلی‌مورفیسم FokI هیچ افزایش خطر چشمگیری در بیماران پاسخ‌دهنده به درمان و غیر پاسخ‌دهنده به درمان، از خود نشان نمی‌دهد ($OR=0/86$ ، $CI=0/95$ ، $1/22 - 0/61$).
مقایسه فراوانی آ‌لی پلی‌مورفیسم FokI بین دو گروه پاسخ‌دهنده و غیر پاسخ‌دهنده به درمان: فراوانی آ‌ل T و C نیز در گروه کنترل و بیمار محاسبه شد. باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده تفاوت معناداری بین ال‌های دو گروه مشاهده نشد. همان‌طور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود نسبت شانس حدود ۱ بوده و ژنوتیپ‌های مختلف شانس حدوداً یکسانی در پاسخ و عدم پاسخ به درمان دارند.

بررسی نتایج پلی‌مورفیسم TaqI: مقایسه پلی‌مورفیسم TaqI در بین دو گروه مورد مطالعه توسط تست مربع کای - اسکوار حدود اطمینان $p=0/50$ را نشان داد و مشخص شد،

آ‌لی مربوط به هر پلی‌مورفیسم در افراد سالم و بیمار و سپس بین این دو گروه و مقایسه این مقادیر از نرم‌افزار SNP Analyzer نیز استفاده گردید. بیه‌منظورترسیم گراف‌ها از نرم‌افزار Prism ورژن ۵ استفاده شده است.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تأیید شده است (کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1396.149). ۲۰۰ بیمار مبتلا به مالتیپل اسکروزیس با رضایت شخصی خود در مطالعه شرکت کردند. هم‌چنین این مطالعه مصوب کمیته اخلاق بوده و دارای کد اخلاق می‌باشد.

نتایج

مشاهده ژل بعد از الکتروفورز نشان‌دهنده تکثیر قطعه مورد انتظار بود. با مقایسه محصولات تکثیری مربوط به پلی‌مورفیسم‌ها با ladder می‌توان نتیجه گرفت که اندازه محصول‌های PCR با اندازه‌های مورد انتظار همخوانی دارد. نتایج حاصل از هضم آنزیمی محصولات PCR در جداول ۱ تا ۴ آورده شده و شکل ۲ باندهای حاصل از هضم آنزیمی مربوط به چهار پلی‌مورفیسم در چهار بیمار مختلف نیز در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج آماری حاصل از بررسی ژنوتیپ‌ها و آ‌ل‌ها در محل

پلی‌مورفیسم‌ها

بررسی ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ApaI: انجام تست آماری مربع کای - اسکوار حدود اطمینان $p=0/68$ را نشان داد و مشخص شد، رابطه آماری معنی‌داری بین هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌ها و پاسخ یا عدم پاسخ به درمان وجود ندارد. در مطالعه حاضر، آنالیزهای آماری پلی‌مورفیسم ApaI هیچ افزایش خطر چشمگیری در ارتباط با ژنوتیپ AA و پاسخ و عدم پاسخ به درمان نشان نداد ($OR=0/96$ ، $CI=0/95$ ، $1/50 - 0/61$). از طرف دیگر فراوانی آ‌ل A و C نیز با نرم‌افزار SPSS version 16 در گروه کنترل و بیمار محاسبه شد، باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده تفاوت معناداری در فراوانی ال‌لی در دو گروه مشاهده نشد. همان‌طور که در

فراوانی آلل A و G نیز در گروه کنترل و بیمار آنالیز شد که باتوجه به نتایج به دست آمده تفاوت معناداری بین الل‌های دو گروه مشاهده نشد. همان‌طور که در جدول ۸ مشاهده می‌شود نسبت شانس حدود ۱ بوده و ژنوتیپ‌های مختلف شانس حدوداً یکسانی در پاسخ و عدم پاسخ به درمان دارند.

رابطه آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های حاصل و بیماری وجود ندارد. در مطالعه حاضر، آنالیزهای آماری پلی‌مورفیسم TaqI هیچ افزایش خطر چشمگیری در ژنوتیپ AA در دو گروه پاسخ‌دهنده به درمان و غیر پاسخ‌دهنده به درمان از خود نشان نداد (OR=۰/۸۴، CI=۰/۹۵-۱/۲۳، P=۰/۵۷). از طرف دیگر

جدول ۱: قطعات حاصل از هضم محصول PCR پلی‌مورفیسم ApaI rs7975232 توسط آنزیم ApaI

اندازه و تعداد قطعات (bp)	۴۰۰+۳۰۰	۴۰۰+۳۰۰+۷۰۰	۷۰۰
نوع ژنوتیپ	CC	AC	AA

جدول ۲: قطعات حاصل از هضم محصول PCR پلی‌مورفیسم BsmI rs1544410 توسط آنزیم BsmI

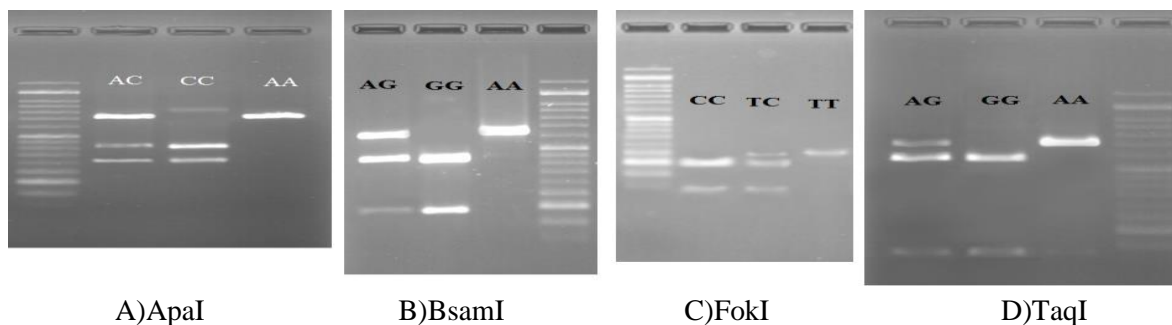
اندازه و تعداد قطعات (bp)	۶۰۰	۶۰۰+۴۵۳+۱۷۸	۱۷۸+۴۵۳
نوع ژنوتیپ	AA	AG	GG

جدول ۳: قطعات حاصل از هضم محصول PCR پلی‌مورفیسم FokI rs10735810 توسط آنزیم FokI

اندازه و تعداد قطعات (bp)	۲۵۷	۲۵۷+۲۰۲+۵۴	۲۰۲+۵۴
نوع ژنوتیپ	TT	CT	CC

جدول ۴: قطعات حاصل از هضم محصول PCR پلی‌مورفیسم TaqI rs731236 توسط آنزیم TaqI

اندازه و تعداد قطعات (bp)	۷۰۰	۷۰۰+۱۱۹+۵۸۲	۵۸۲+۱۱۹
نوع ژنوتیپ	AA	AG	GG

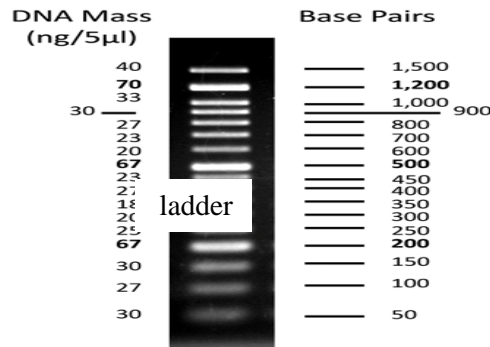


A) ApaI

B) BsmI

C) FokI

D) TaqI



شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصولات حاصل از برش آنزیم‌های محدودکننده

جدول ۵: محاسبه نسبت شانس پلی مورفیسم ApaI

		Variables in the Equation					95.0% C.I. for EXP(B)		
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Lower	Upper
Step 1 ^a	Apa	.012	.211	.003	1	.956	1.012	.669	1.530
	Constant	.098	.364	.073	1	.787	1.103		

a. Variable(s) entered on step 1: Apa.

		Variables in the Equation					95.0% C.I. for EXP(B)		
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Lower	Upper
Step 1 ^a	APA	-.245	.312	.619	1	.432	.783	.425	1.442
	Constant	.336	.484	.483	1	.487	1.399		

a. Variable(s) entered on step 1: APA.

جدول ۶: محاسبه نسبت شانس پلی مورفیسم BsmI

		Variables in the Equation					95.0% C.I. for EXP(B)		
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Lower	Upper
Step 1 ^a	BsmI	-.122	.176	.485	1	.486	.885	.627	1.249
	Constant	.305	.391	.606	1	.436	1.356		

a. Variable(s) entered on step 1: BsmI.

		Variables in the Equation					95.0% C.I. for EXP(B)		
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Lower	Upper
Step 1 ^a	BsmI	-.297	.344	.743	1	.389	.743	.379	1.459
	Constant	.479	.549	.760	1	.383	1.615		

a. Variable(s) entered on step 1: BsmI.

جدول ۷: محاسبه نسبت شانس پلی مورفیسم FokI

		Variables in the Equation					95.0% C.I. for EXP(B)		
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Lower	Upper
Step 1 ^a	FokI	-.333	.335	.993	1	.319	.716	.372	1.380
	Constant	.526	.527	.995	1	.318	1.692		

a. Variable(s) entered on step 1: FokI.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a								
FokI	-.132	.178	.549	1	.459	.876	.618	1.242
Constant	.324	.377	.739	1	.390	1.383		

a. Variable(s) entered on step 1: FokI.

جدول ۸: محاسبه شانس پلیمورفیسم TaqI

Variables in the Equation

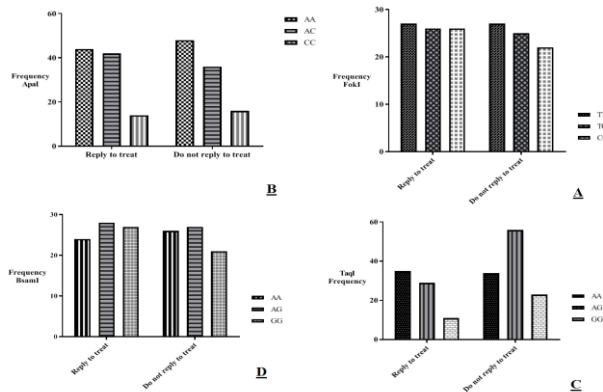
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a								
taqI	-.136	.201	.456	1	.500	.873	.588	1.295
Constant	.290	.359	.652	1	.419	1.337		

a. Variable(s) entered on step 1: taqI.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a								
TaqI	-.288	.313	.846	1	.358	.750	.406	1.384
Constant	.442	.480	.847	1	.357	1.556		

a. Variable(s) entered on step 1: TaqI.



شکل ۲: (A) فراوانی ژنوتیپی FokI (B) فراوانی ژنوتیپی ApaI (C) فراوانی ژنوتیپی TaqI (D) فراوانی ژنوتیپی BsmI

شامل دو گروه پاسخ‌دهنده به درمان با اینترفرون بتا و عدم پاسخ‌دهنده به درمان با اینترفرون بتا در جمعیت مردم استان قزوین در خلال سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۷ پرداخته شد. اکثر مطالعات پیشین به بررسی این پلی‌مورفیسم‌ها به صورت انفرادی، دو، سه و یا چهارتایی در بیماران MS و مقایسه آن با افراد کنترل پرداخته (۱۹-۱۱) که دارای نتایج متفاوتی بوده‌اند،

بحث

سه پلی‌مورفیسم ApaI، TaqI و BsmI در ناحیه 3'UTR و پلی‌مورفیسم FokI در اگزون ۲ ژن VDR یا رسپتور ویتامین D واقع شده است (۱۰). در این مطالعه با استفاده از تکنیک Restriction fragment Amplified Polymorphism (RFLP) به بررسی این پلی‌مورفیسم‌ها در افراد بیمار MS که

بررسی این پلی‌مورفیسم‌ها در بیماران MS در مقایسه با افراد کنترل پرداخته‌اند در مطالعه پیشرو هر دو گروه مطالعه‌شونده بیمار MS بوده و تفاوت آن‌ها پاسخ و عدم پاسخ به درمان با اینترفرون بتا می‌باشد. به‌رحال نتایج بسیار ضدونقیض در مطالعات گروه سالم و بیمار و مقایسه اختلافات در مطالعات پیشین می‌تواند ناشی از مسائل مختلفی همانند اندازه و حجم نمونه، جمعیت مورد مطالعه و خطای اندازه‌گیری ... باشد. باتوجه‌به شرایط بالینی بیماران MS و محدودیت‌ها و شرایط مختلف مانند نوع داروی مصرفی، عدم وجود پرونده پزشکی کامل و همچنین محدودیت بودجه و زمان، دسترسی به تعداد بالای این بیماران کاری دشوار است؛ بنابراین در مطالعه حاضر امکان مطالعه بر روی تعداد بیشتری از بیماران وجود نداشت؛ لذا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده حجم نمونه بالا و مناسب جهت بررسی بهتر مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

پیشنهاد می‌شود که با توجه به این مهم که پلی‌مورفیسم‌ها و واریانت‌ها می‌توانند در قومیت‌های مختلف پراکندگی متفاوتی داشته باشند و با توجه به چند قومیتی بودن کشورمان در نواحی و اقوام مختلف مطالعات مشابه به منظور شناخت بهتر این بیماری صورت بگیرد.

سپاس‌گزاری

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجویی بوده که با کد ۶۷۲۵ در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد مصوب گردیده است. از تمامی عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند سپاسگزاریم.

حامی مالی: دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
تعارض در منافع: وجود ندارد.

به‌طور مثال در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت اسلواکی انجام شد، هیچ‌گونه ارتباطی بین پلی‌مورفیسم‌های ApaI و TaqI با پیشرفت بیماری MS پیدا نشد (۱۳)، در حالیکه مطالعه‌ای که در جمعیت مردم کویت صورت گرفت، نشان داد که واریانت ApaI با کاهش پیشرفت بیماری در ارتباط است و پلی‌مورفیسم TaqI با خطر ابتلا به MS ارتباط مستقیم دارد (۱۴). این در حالی است که محققین در مطالعه بر روی بیماران تونسی به این نتیجه رسیدند که پلی‌مورفیسم در این دو واریانت باعث افزایش ابتلا به MS می‌شود (۱۵). در مطالعه مربوط به اسلواکی مشخص شد که ژنوتایپ AA از BsmI خطر ابتلا به MS را کاهش می‌دهد (۱۳) در صورتی‌که مطالعه بر روی مردم کویت نشان داد که BsmI با خطر ابتلا به MS ارتباط مستقیم دارد (۱۴) اما یک مقاله مروری سیستماتیک بیان کرد که ارتباطی بین پلی‌مورفیسم BsmI و ابتلا به MS وجود ندارد. این مقاله بیان کرد که ژنو تایپ FF FokI فاکتور مهمی در خطر ابتلا به MS به حساب می‌آید (۲۰). همچنین مطالعه در جمعیت ترکیه یک ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم FokI و بیماری MS را نشان داد (۱۶). اما در مطالعه‌ای در ایران در مورد پلی‌مورفیسم FokI ارتباط معناداری بین گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد (۱۸). در مطالعه دیگری که بر روی افراد سیسیلی صورت گرفت مشخص شد که پراکندگی ژنوتیپی و فراوانی آللی این ۴ پلی‌مورفیسم تفاوت معنی‌داری در بین دو گروه بیمار و کنترل از خود نشان نمی‌دهد و به اشکال و دوره MS نامربوط می‌باشد (۱۹). همان‌طور که شرح آن رفت در مطالعه حاضر هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در جمعیت افراد بیمار MS در بین دو گروه مشاهده نشد. از آن‌جهت که مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر وجود ندارد؛ لذا قیاس مناسبی نیز نمی‌توان انجام داد زیرا بر خلاف مطالعات قبلی که به

References:

- 1-Kidd PM. *Multiple Sclerosis, An Autoimmune Inflammatory Disease: Prospects for its Integrative Management*. Altern Med Rev 2001; 6(6): 540-66.
- 2-Goldenberg MM. *Multiple Sclerosis Review*. Pharmacy and Therapeutics 2013; 37(3): 175-84.
- 3-Etemadifar M, Sajjadi S, Nasr Z, Firoozeei TS, Abtahi S-H, Akbari M, et al. *Epidemiology of Multiple Sclerosis in Iran: A Systematic Review*. Eur Neurol 2013; 70(5-6): 356-63.
- 4-Rog DJ, Mottershead JP. *The Role of Interferon Beta in Multiple Sclerosis Management*. Future Prescriber 2006; 7(3): 15-9.
- 5-Pereira VCSR, Malfetano FR, Meira IDA, Souza LFD, Liem AM, Maiolino A, et al. *Clinical Response to Interferon Beta and Glatiramer Acetate in Multiple Sclerosis Patients: A Brazilian Cohort*. Arq Neuropsiquiatria 2012; 70(10): 774-9.
- 6-Canto E, Oksenberg JR. *Multiple Sclerosis Genetics*. MSJ 2018; 24(1): 75-9.
- 7-Arai H, Miyamoto KI, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. *A Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in the Translation Initiation Codon: Effect on Protein Activity and Relation to Bone Mineral Density in Japanese Women*. J Bone Miner Res 1997; 12(6): 915-21.
- 8-Yucel FE, Kamıslı O, Acar C, Sozen M, Tecellioglu M, Ozcan C. *Analysis of Vitamin D Receptor Polymorphisms in Patients with Familial Multiple Sclerosis*. Med Arch 2018;72(1): 58.
- 9- Cakina S, Ocak O, Ozkan A, Yucel S, Karaman HIO. *Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Multiple Sclerosis Disease :A Case-Control Study*. Revista Romana de Medicina de Laborator 2018; 26(4): 489-95.
- 10-Jedrzejuk D, Łaczmański Ł, Milewicz A, Kuliczowska-Plaksej J, Lenarcik-Kabza A, Hirnle L, et al. *Classic PCOS Phenotype is Not Associated with Deficiency of Endogenous Vitamin D and VDR Gene Polymorphisms Rs731236 (Taqi), Rs7975232 (ApaI), Rs1544410 (Bsmi), Rs10735810 (Foki): a Case–Control Study of Lower Silesian Women*. Gynecol Endocrinol 2015; 31(12): 976-9.
- 11-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*. J Neurol Sci 1999; 166(1): 47-52.
- 12-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*. J Neurogenet 2005; 19(1): 25-38.
- 13-Čierny D, Michalík J, Škereňová M, Kantorová E, Sivák Š, Javor J, et al. *ApaI , Bsmi and Taqi VDR Gene Polymorphisms in Association with Multiple Sclerosis in Slovaks*. Neurol Res 2016; 38(8): 678-84.
- 14-Al-Temaimi RA, Al-Enezi A, Al-Serri A, Al-Roughani R, Al-Mulla F. *The Association of Vitamin D Receptor Polymorphisms with Multiple Sclerosis in a Case-Control Study from Kuwait*. PloS One 2015; 10(12): e0142265.
- 15-Ben-Selma W, Ben-Fredj N, Chebel S, Frih-Ayed M, Aouni M, Boukadida J. *Age-And Gender-Specific Effects on VDR Gene Polymorphisms and Risk of the Development of Multiple Sclerosis in Tunisians:*

- A Preliminary Study*. Int J Immunogenet 2015; 42(3): 174-81.
- 16-**Kamisli O, Acar C, Sozen M, Tecellioglu M, Yücel FE, Vaizoglu D, et al. *The Association between Vitamin D Receptor Polymorphisms and Multiple Sclerosis in a Turkish Population*. Mult Scler Relat Disord 2018; 20: 78-81.
- 17-**Narooie-Nejad M, Moossavi M, Torkamanzehi A, Moghtaderi A, Salimi S. *Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and the Risk of Multiple Sclerosis in South Eastern of Iran*. J Mol Neurosci 2015; 56(3): 572-6.
- 18-**Abdollahzadeh R, Fard MS, Rahmani F, Moloudi K, Azarnezhad A. *Predisposing Role of Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphisms in the Development of Multiple Sclerosis: A Case-Control Study*. J Neurol Sci 2016; 367: 148-51.
- 19-**Agnello L, Scazzone C, Sasso BL, Bellia C, Bivona G, Realmuto S, et al. *VDBP, CYP27B1, and 25-Hydroxyvitamin D Gene Polymorphism Analyses in a Group of Sicilian Multiple Sclerosis Patients*. Biochem Genet 2017; 55(2): 183-92.
- 20-**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.

Evaluation of the Relationship between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Multiple Sclerosis Patients Who Responsive or non-Responsive to Treatment with Beta Interferon

Zeinab Fatahi¹, Morteza Samadi^{1,2}, Reyhaneh Sadat Sandoghsaz¹,
Reza Najafipour³, Safar Ali Alizadeh⁴

Original Article

Introduction: Multiple Sclerosis is a chronic, inflammatory disorder of the central nervous system, which leads to demyelination of nerves. Treatment with interferon beta is one of the best approaches to reduce recurrence and progression of the disease. The aim of this study is to search for the relationship between 4 polymorphisms FokIrs 10735810, TaqIrs 731236, ApaI rs797532 and BsmIrs 1544410 located in the vitamin D receptor in MS patients responsive and non-responsive to interferon beta treatment and pave the way for the correct and fast administration of the appropriate drug, as well as reducing time, cost and lack of success in treatment.

Methods: The type of study is observational and the study method is case-control. Blood samples were taken from 200 MS patients who were treated with interferon (100 responders and 100 non-responders). Using PCR-RFLP technique, the samples were subjected to enzymatic digestion with restriction enzymes ApaI, FokI, TaqI and BsmI. The data were evaluated using SPSS version 16, SNP Analyzer and Prism software, and K-tests and logistic regression.

Results: A significant difference in the genotypic and allelic frequencies of ApaI ($p=0.68$), BsmI ($p=0.65$), FokI ($p=0.57$) and TaqI ($p=0.50$) polymorphisms in the patients between the two responsive and non-responsive groups to treatment was not observed.

Conclusion According to our findings, there was no significant correlation between ApaI, FokI, TaqI and BsmI polymorphisms located in vitamin D receptor gene and response to treatment.

Keywords: Multiple sclerosis, Vitamin D receptor gene, Beta-interferon.

Citation: Fatahi Z, Samadi M, Sandoghsaz R, Najafipour R, Alizadeh S. **Evaluation of the Relationship between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Multiple Sclerosis Patients Who Responsive or Non-Responsive to Treatment with Beta Interferon.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2023; 31(3): 4694-6504.

¹Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

²Department of Immunology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isafahan, Iran.

³Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

⁴Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09126901505, email: Samadi.for@gmail.com