

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

دکتر سیدمهران مرعشیان^۱، دکتر پریسا فرنیآ^۲، شیما سیف^۳، صابر انوشه^۴

نویسنده 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 لکوسیستی انسانی، گیرنده‌ی ویتامین D، پروتئین ماکروفاژی مرتبط با مقاومت طبیعی از نوع 1، لکترین متصل شونده به مانوز و نیز فاکتور نکروز توموری اشاره نمود. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی مرفیسم‌های ژن بیان کننده‌ی گیرنده‌ی ویتامین D شامل *FokI*، *BsmI*، *Apal* و *TaqI* با تمایل به ابتلا به بیماری سل ریوی انجام گردید.

روش بررسی: این مطالعه به صورت 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 پلی مرفیسم‌ها، ژنوتیپ هاپلوئید *AbfT* و دیپلوئید *AAbbFfTT* تنها ژنوتیپ‌هایی بودند که از نظر آماری بین دو گروه 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، پلی مرفیسم

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 میکروبی‌شناسی، 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.

مقدمه

یک سوم جمعیت جهان و به عبارتی 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 به صورت 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 (۱ و ۲). در سال ۱۹۲۶ در طی فرآیند واکسیناسیون در لوبک (Lubeck) آلمان، بطور اتفاقی مایعی محتوی باسیل زنده مایکوباکتریوم توبرکلوز (باسیل انسانی) به جای 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 (۴-۶).

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)، لکترین 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 از 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 پلی‌مرفیسم‌های 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 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

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 لکوسیت‌ها می‌گردد.

از پروتئیناز K برای خارج نمودن پروتئین خون استفاده شد و دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد که نقطه‌ی دمایی ایده آل (optimal) برای فعالیت مناسب پروتئیناز 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 به مدت طولانی در دمای یخچال نگهداری نمود).

ژنوتایپینگ VDR: تاکنون چهار جایگاه پلی‌مرفیسم با اهمیت از ژن بیان‌کننده‌ی 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

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.ت.ث، 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 ممانعت‌کننده 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 سانتریفیوژ صورت گرفت. جهت کسب نتایج مناسب این اقدام ۴ تا ۳ بار تکرار گردید. به دلیل عدم نیاز به جداسازی

استفاده شد. جدول شماره ۱ انواع پرایمرها و محصولات آنها و پروتکلی که در این مطالعه جهت PCR بکار برده شد را نشان می دهد.

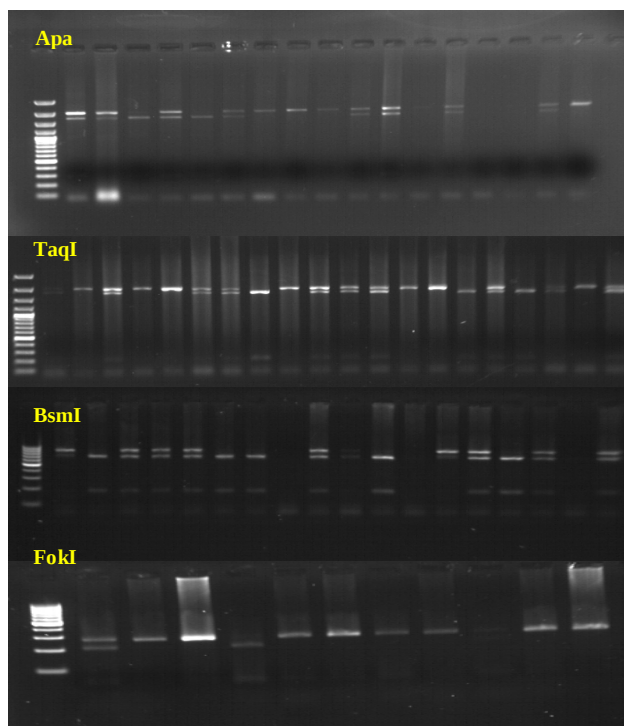
شد. از آنجا که پلی مرفیسم های *TaqI* و *ApaI* محل قرارگیری بسیار نزدیک بر روی اگزون IX کروموزوم نامبرده دارند، جهت انتخاب آن دو از یک پرایمر

جدول ۱؛ پرایمرهای مورد استفاده جهت هر پلی مرفیسم و پروتکل PCR

پلی مرفیسم	پرایمر	اندازه محصول (bp)	پروتکل PCR
<i>ApaI</i> <i>TaqI</i>	5' – GGG ACG ATG AGG GAT GGA CAG AGC - 3'	۲۰۰۰	۹۶ درجه ی سانتی گراد برای ۱ دقیقه ۳۰ دور شامل:
	5' – GGA AAG GGG TTA GGT TTG ACA GGA - 3'		۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ۵۵ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه
<i>BsmI</i>	5' – CAA CAA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3	۸۲۵	۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
	5' – AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG – 3'		۶۳ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
			۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه
			۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه
<i>FokI</i>	5' – AGCTGG CCC TGG CACTGA CTC TGC TCC - 3'	۲۶۵	۹۶ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ۳۰ دور شامل:
	5' – ATGGAA ACA CCT TGC TTC TTC TTC CTC - 3'		۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه
			۶۰ درجه ی سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه ۷۵ درجه ی سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه

فرد که قطعات حاصل از اثرات آنزیم های محدود کننده بر DNA وزن های مختلف را دارا بودند، با توجه به وزن خود، باند ویژه ای در آگارز ایجاد کردند که قابل مشاهده و تفکیک از سایر ژنوتیپ ها بود. تفسیر نتایج بر اساس این باندها و طول قطعه ی شکسته شده صورت گرفت. جدول شماره ۲ نشان دهنده اندازه ی قطعات حاصل از RFLP بود.

محصولات PCR به مدت یک شب در تماس با آنزیم محدود کننده (restriction enzyme) قرار گرفتند. محصولات حاصل از عملکرد آنزیم های محدود کننده بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد برده شده و بررسی گردید و باندهای حاصل از الکتروفورز با برمید اتیدیوم و تحت اشعه UV بررسی شدند. نمونه ای از باندهای حاصل برای هر پلی مرفیسم در شکل شماره ۱ نمایان است. بر اساس ژنوتیپ پلی مرفیسم موجود در هر



شکل ۱: باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات *PCR-RFLP*

اگر باندهای قابل مشاهده در مورد هر پلی مرفیسم 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 پلی مرفیسم مذکور بود. ردیف نردبانی سمت چپ به عنوان معیار تعیین محل باندها به کار رفت.

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

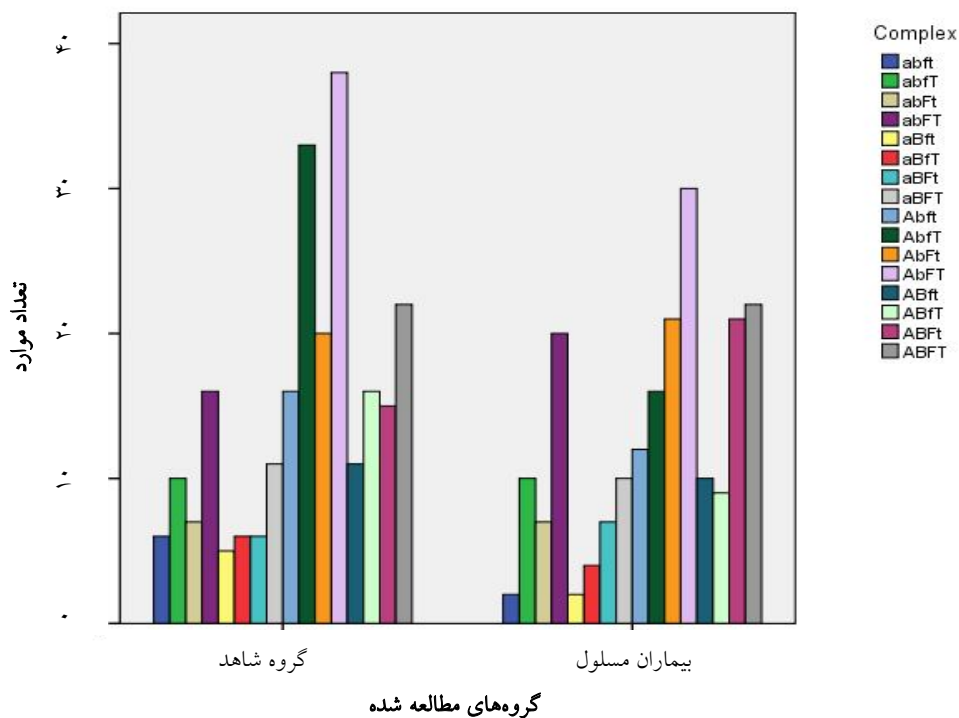
پلی مرفیسم	دما (درجه‌ی سانتی گراد)	اندازه‌ی محصول (bp)
ApaI	۵۵	AA (۲۰۰۰), Aa (۲۰۰۰, ۱۷۰۰, ۳۰۰), aa (۱۷۰۰, ۳۰۰)
TaqI	۶۵	TT (۲۰۰۰), Tt (۲۰۰۰, ۱۸۰۰, ۲۰۰), tt (۱۸۰۰, ۲۰۰)
BsmI	۶۵	BB (۸۲۵), Bb (۸۲۵, ۶۵۰, ۱۷۵), bb (۶۵۰, ۱۷۵)
FokI	۳۷	FF (۲۶۵), Ff (۲۶۵, ۱۹۶, ۶۹), ff (۱۹۶, ۶۹)

این فراوانی‌ها و تعیین نسبت شانس (odds ratio) و فاصله اطمینان (confidence interval) برای هر ژنوتیپ به توصیف ارتباط بین ژنوتیپ‌های خاص با

این مطالعه پس از تعیین ژنوتیپ‌های مربوط به هر جایگاه اختصاصی اثر آنزیم‌ها، فراوانی آن‌ها را در هر گروه به دست آورد. و پس از مقایسه دو گروه مورد و شاهد از نظر

(descriptive) پرداخته است.

بروز یا عدم بروز بیماری سل به صورت کاملاً توصیفی



شکل ۲: فراوانی ژنوتیپ‌های ترکیبی پلی‌مرفیسم‌های VDR به صورت 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 ($P=0/46$) و Taq I ($P=0/97$) 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

۰/۵۶ و برای AAbbFfTT برابر ۰/۲ با دامنه‌ی ۰/۴ تا ۰/۹۴ بود. نمودار شماره‌ی ۲ فراوانی ژنوتیپ‌های مذکور را نشان می‌دهد و جدول شماره‌ی ۳ نشان دهنده‌ی موارد دارای اختلاف معنی‌دار به صورت خلاصه می‌باشد.

پلی‌مرفیسم‌ها، ژنوتیپ‌های پلوئید AbfT و دیپلوئید AAbbFfTT تنها ژنوتیپ‌هایی بودند که از نظر آماری بین دو گروه اختلاف فراوانی معنی‌دار داشتند. نسبت شانس برای AbfT برابر ۰/۲۴ با دامنه اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۰/۱۱ تا

جدول شماره ۳. فراوانی ژنوتیپ‌های ترکیبی پلی‌مرفیسم‌های VDR

ژنوتیپ	شاهد	مورد	نسبت شانس	فاصله‌ی اطمینان (۹۵٪)	فراوانی
AbfT	۳۳ (۶۶٪)	۱۶ (۷۶٪)	۰/۲۴۲	۰/۱۰۵-۰/۵۵۸	
AAbbFfTT	۹ (۱۸٪)	۲ (۲۲٪)	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 (۴ و ۹). 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 (۹-۱۱). در برخی مطالعات نیز ال 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، ال غالب F یک عامل حمایت کننده در مقابل سل ریوی به شمار آمده است. این مطالعه، ال 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 متآنالیز 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

توجیه است. چرا که مطالعات مذکور اهمیت حضور گروه شاهد را کم‌رنگ‌تر از قبل نموده‌اند (۱۵ و ۱۶). 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 *AAAbbFfTT* 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. Available 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. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>.
- 3- Dubos R, Dubos J. The white plague:

تحقیقات معدودی صورت گرفته است، لذا یکی از نقاط قوت مطالعه‌ی حاضر است. دو ژنوتیپ *AbfT* و *AAAbbFfTT* 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. در نظر داشتن تداخلات و تعاملات عوامل مخدوش کننده 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 تعیین کننده 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

- 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.

- 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.

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

Marashian M¹, Farnia P¹, Seif SH¹, Anoosheh S¹

¹Mycobacteriology 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 different 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*