

بررسی ارتباط ژنوتیپی ژن گیرنده‌ی ویتامین D در دو گروه بیماران اسپورادیک و فامیلیال پارکینسون

دکتر مریم استاد شریف^۱، دکتر رخساره معمار^۲، دکتر مژگان اسدیان^۳، مریم ایزدی^۴، مرتضی جوادی راد^۵، دکتر احمد چیت‌ساز^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ارتباط ویتامین D و بیماری پارکینسون به خوبی مشخص شده است. این ویتامین از طریق گیرنده‌ی ویتامین D (Vitamin D receptor) یا VDR عمل می‌کند. ژن گیرنده‌ی ویتامین D دارای پلی‌مورفیسم کدون آغازین است که توسط آنزیم محدود کننده‌ی FokI شناسایی می‌شود. بعضی از مطالعات با اشاره به ارتباط بین FokI و پارکینسون، نشان داده‌اند که این پلی‌مورفیسم، عملکرد گیرنده‌ی ویتامین D را تغییر می‌دهد. هدف از این مطالعه، شناسایی ارتباط بین پلی‌مورفیسم FokI در ژن گیرنده‌ی ویتامین D و بروز پارکینسون و ژنوتیپ‌های به دست آمده در بیماران مبتلا به پارکینسون اسپورادیک و فامیلیال بود.

روش‌ها: در بخش اسپورادیک این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، نمونه‌ی خون از ۶۰ نفر بیمار مبتلا به پارکینسون از منطقه‌ای در جنوب غرب اصفهان و ۶۲ نفر افراد سالم از همان منطقه جمع‌آوری شد. همچنین، در بررسی فرم فامیلیال پارکینسون، ۶ نمونه‌ی مورد و ۷ نمونه‌ی شاهد از یک خانواده ارزیابی گردید. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) به منظور ارزیابی ژنوتیپ‌ها انجام گرفت. همچنین، عوامل سرمی بیماران و افراد سالم شجره، مانند ۲۵(OH-D) (۲۵-Hydroxyvitamin D)، هورمون پاراتیروئید، کلسیم، فسفر و آلکالین فسفاتاز مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: در بخش اسپورادیک، از ۶۰ بیمار، فراوان‌ترین ژنوتیپ FF (۵۱/۷ درصد) و در گروه شاهد Ff (۵۱/۶ درصد) بود. حفاظت در مقابل پیشرفت پارکینسون زمانی که آلل F وجود داشته باشد، مشاهده شد، اما معنی‌دار نبود ($P = ۰/۲۹۰$). از سوی دیگر، استعداد ابتلا به پارکینسون با آلل f ارتباط نشان داد، اما معنی‌دار نبود ($P = ۰/۳۹۰$). در خانواده‌ی مورد مطالعه، مشخص شد که آلل f قادر است تا ۴ برابر نرخ بروز بیماری پارکینسون را در این شجره افزایش دهد، اما این ارتباط معنی‌دار نبود ($P = ۰/۲۲۰$)؛ به طوری که افراد با ژنوتیپ ff، ۲/۷ برابر بیشتر به بیماری پارکینسون مبتلا شدند ($P = ۰/۴۵۰$). بیماران با ژنوتیپ ff نسبت به بیماران با ژنوتیپ FF، سطوح سرمی بالاتری از آلکالین فسفاتاز، پاراتورمون و ویتامین D را نشان دادند، اما این ارتباط‌ها معنی‌دار نبودند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه تنها در پلی‌مورفیسم FokI متمرکز شد؛ بنابراین تجزیه و تحلیل سایر انواع پلی‌مورفیسم در ژن گیرنده‌ی ویتامین D، مانند BsmI و TaqI، ApaI برای به دست آوردن استراتژی‌های مناسب‌تر برای درمان پارکینسون لازم است. همچنین، معنی‌دار نبودن ارتباط‌ها، ممکن است به دلیل کوچک بودن شجره و تعداد کم داده‌ها باشد.

واژگان کلیدی: بیماری پارکینسون، گیرنده‌ی ویتامین D، فرم اسپورادیک، فرم فامیلیال

ارجاع: استاد شریف مریم، معمار رخساره، اسدیان مژگان، ایزدی مریم، جوادی راد مرتضی، چیت‌ساز احمد. **بررسی ارتباط ژنوتیپی ژن گیرنده‌ی ویتامین D در دو گروه بیماران اسپورادیک و فامیلیال پارکینسونیسم.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۵): ۱۷۱۸-۱۷۱۸

۱- استادیار، گروه علوم پایه‌ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد، اصفهان، ایران

۳- نورولوژیست، صنایع ذوب آهن، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد، اصفهان، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۶- استاد، گروه مغز و اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

بیماری پارکینسون (PD یا Parkinson's disease) دومین اختلال نورودژنراتیو شایع پس از بیماری آلزایمر است. این بیماری از جمله شایع‌ترین بیماری‌های تخریبی سیستم اعصاب مرکزی است که با تخریب تدریجی سلول‌های عصبی نیگرواستریاتال همراه است. بروز بیماری پارکینسون در حدود ۱۵ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در جمعیت عمومی است که در جمعیت بالای ۶۵ سال، به ۱۶۰ در ۱۰۰۰۰۰ افزایش می‌یابد. بیماری پارکینسون در مردان بیشتر از زنان دیده می‌شود (نسبت جنسی در حدود ۱/۸ به ۱) (۱).

بیماری پارکینسون اغلب به صورت کندی حرکت یا لرزش در حال استراحت در یک یا چند اندام بروز می‌کند. از دیگر تظاهرات شایع، می‌توان به اشکال در انجام کارهای ظریف و سفتی و درد شانه اشاره کرد. برای تشخیص بالینی بیماری پارکینسون، وجود کندی حرکات (Brady kinesia) و حداقل یکی از علائم سفتی عضلانی (Muscle rigidity)، ترمور در حال استراحت با تواتر ۴-۶ Hz و عدم ثبات وضعیتی بدن لازم است. شناسایی ژن‌های مرتبط با اشکال ارثی بیماری پارکینسون، عقیده‌ی قدیمی مبنی بر علت غیر ژنتیکی بیماری پارکینسون را به چالش کشانده است؛ در حالی که در ۲ درصد از تمام بیماران مبتلا به پارکینسون می‌توان یک جهش ژنی را کشف کرد (۲). این درصد در گروه‌های سنی جوان و با سابقه‌ی خانوادگی مثبت و یا در نژادهای خاص به ۷۷ درصد می‌رسد. با این حال، در بیشتر بیماران واکنش بین چندین ژن، آثار تعدیل‌کننده‌ی آلل‌های مستعد‌کننده و عوامل اپی‌ژنتیک، تأثیر عوامل محیطی و سن یا ترکیب این موارد، به عنوان علل اصلی بیماری در نظر

گرفته می‌شوند. اگر چه تا کنون برای درمان این بیماری مطالعات گسترده‌ای صورت گرفته است، اما هنوز علت اصلی آن به طور دقیق مشخص نشده است (۳).

برخی از تحقیقات، اثرگذاری عواملی مانند استرس اکسیداتیو، التهاب، نقص عملکردی میتوکندری‌ها (۴-۶)، رژیم غذایی (۷-۸) و برخی ریز مغذی‌ها (۹) را در تشدید علائم پارکینسون مثبت ارزیابی کرده‌اند. کلسیم و ویتامین D از جمله ریز مغذی‌هایی هستند که به نظر می‌رسد در تعیین شدت این بیماری نقش داشته باشند.

به تازگی، نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که سطح پایین ویتامین D سرم با شدت بالای بروز پارکینسون در ارتباط است (۱۱-۱۰). بر خلاف مطالعات قبلی، نشان داده شده است که نه تنها میزان ویتامین D در بیماران مبتلا به پارکینسون کاهش نمی‌یابد، بلکه تا حدی در طول پیگیری از بیماری (۱۲) افزایش یافته است. در مطالعه‌ی دیگری، اگر چه بسیاری از بیماران (۷۲/۸ درصد) دارای سطوح ناکافی از ۲۵OH D (۲۵-Hydroxyvitamin D) ($< 30 \text{ ng/ml}$) بودند، اما تنها ۳۸/۴ درصد از بیماران سطوح کمبود ۲۵OH D را نشان دادند ($< 20 \text{ ng/ml}$) و ارتباطی بین مراحل H&Y (Hohn & Yar) و نمرات Unified Parkinson's disease rating stage با سطح ویتامین D در بیماران مبتلا به پارکینسون دیده نشد (۱۳).

عملکرد ویتامین D از طریق گیرنده‌ای است که عضوی از خانواده‌ی گیرنده‌های هسته‌ای است. ژن گیرنده‌ی ویتامین D بر روی ناحیه‌ی کروموزوم ۱۲ (q۱۲-q۱۴) واقع شده است و تعدادی پلی‌مورفیسم

منطقه وارد مطالعه شدند. بیماران مبتلا به پارکینسون از بخش مغز و اعصاب بیمارستان الزهرا (س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، بین ماه‌های سپتامبر ۲۰۱۱ تا نوامبر ۲۰۱۱ وارد مطالعه شدند. این افراد اگر حداقل دو نشانه‌ی اصلی از پارکینسون (لرزش، سفتی و کندی حرکات) را داشتند، به عنوان گروه بیمار طبقه‌بندی می‌شدند. برای ارزیابی مرحله‌بندی بیماری پارکینسون، از نمره‌ی H&Y (Hohn&Yar) در چهار مرحله از ۱-۱/۵، ۲-۲/۵، ۳ و ۴-۵ استفاده شد (۱).

طراحی B (فامیلیال): در یک خانواده‌ی ایرانی از ۱۳ فرد مطالعه شده، ۶ نفر بیمار (گروه مورد) و ۷ نفر سالم در همان خانواده (گروه شاهد) مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

آنالیز بیوشیمیایی سرم خون: سطح سرمی ۲۵OH_D (محدوده‌ی طبیعی: ۲۰-۳۰ ng/ml) و هورمون پاراتیروئید (PTH یا Parathyroid hormone) (محدوده‌ی طبیعی: ۱۰-۶۵ IU/L) توسط تکنیک آنزیم ایمنواسی (Enzyme immunoassay) اندازه‌گیری شد. سایر آنالیزهای بیوشیمیایی نظیر اندازه‌گیری کلسیم (محدوده‌ی طبیعی: ۸/۲-۱۰/۶ mg/dl)، فسفر (محدوده‌ی طبیعی: ۲/۵-۴/۵ mg/dl) و آلکالین فسفاتاز (محدوده‌ی طبیعی: ۳۰۶-۶۴ mg/dl) توسط روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA و انجام PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism)

DNA افراد مورد و شاهد توسط روش استاندارد هضم با پروتئین کیناز K و به دنبال آن Salt out تخلیص شد. پلی مورفیسم FokI ژن گیرنده‌ی ویتامین D توسط روش

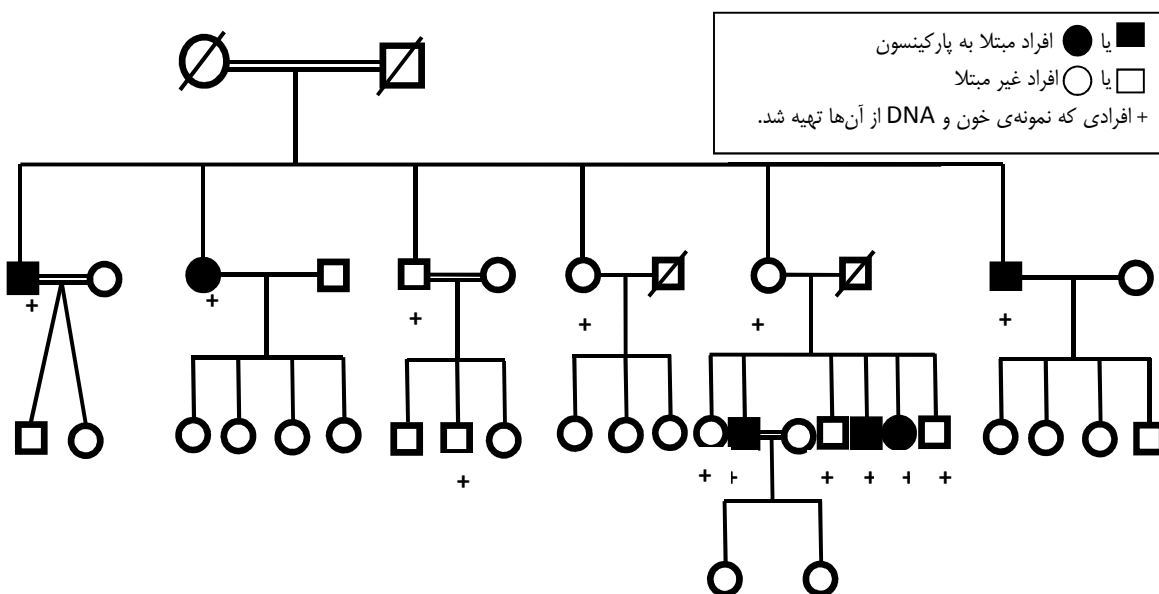
(چند شکلی) در این ژن شناسایی شده است. این گیرنده با اتصال به فرم فعال ویتامین D، به عنوان عامل رونویسی، بیان ژن‌های وابسته به ویتامین D را تنظیم می‌نماید. این عمل از طریق اتصال به المان‌های پاسخ دهنده به ویتامین D که در ناحیه‌ی پروموتور ژن‌های هدف قرار دارند، انجام می‌شود (۱۴-۱۵). به تازگی، مشاهده شده است که ژن VDR یکی از ژن‌های کاندیدا در بیماری‌های عصبی است (۱۶). علاوه بر این، در برخی از مطالعات نشان داده شده است که در معرض خطر بودن و سن شروع پارکینسون با پلی مورفیسم VDR ارتباط دارد (۱۶-۱۷).

بر اساس چنین پیش‌زمینه‌ای، پژوهشگران بر آن شدند تا ارتباط بین پلی مورفیسم ژن VDR و پارکینسون را بررسی کنند. برای این منظور، یکی از گسترده‌ترین (Restriction fragment length polymorphisms) RFLP‌های ژن VDR یعنی FokI (rs ۲۲۲۸۵۷۰ / rs ۱۰۷۳۵۸۱۰) مورد بررسی قرار گرفت. چون FokI RFLP می‌تواند به عنوان یک شاخص مستقل در ژن VDR در نظر گرفته شود؛ بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط خطر ابتلا به پارکینسون، عوامل سرمی و چند شکلی FokI در بخشی از جمعیت ایران بود.

روش‌ها

طراحی مطالعه: در این پژوهش، طراحی بر اساس دو فرم پارکینسون انجام شد. از این رو، این دو فرم A و B نام‌گذاری شدند:

طراحی A (اسپورادیک): ۶۰ بیمار با پارکینسون اسپورادیک از منطقه‌ای در جنوب غرب اصفهان با شیوع بالای این بیماری و ۶۲ فرد سالم از همان



شکل ۱. شجره‌ی مورد مطالعه

وینبرگ (Hardy-Weinberg equation) در جمعیت مورد مطالعه استفاده شد. $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد. از OR (Odd ratio) برای بررسی ارتباط بین عوامل مورد نظر و بیماری استفاده شد و برای این محاسبات، بازه‌ی اطمینان ۹۵ درصد (CI ۹۵ درصد) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

فراوانی آللی جایگاه چند ژنی FokI VDR در جدول ۱ آمده است. فراوانی آلل F در گروه مبتلا، بالاتر از آلل f بود (۷۰/۸ درصد در مقابل ۲۹/۹ درصد). همچنین گرایش بیشتری نسبت به آلل F (۶۴/۵ درصد در مقابل ۳۵/۵ درصد) در افراد شاهد مشاهده گردید. همان‌طور که در جدول ۱ آمده است، محافظت در برابر پیشرفت پارکینسون زمانی دیده می‌شود که آلل F وجود داشته باشد (ارتباط بدون معنی) ($OR = 0/7$ ، $CI: 0/44-1/28$ ، $P = 0/290$). از سوی دیگر، افزایش خطر بیماری

PCR تعیین شد. با استفاده از پرایمرهای Forward (۵′-GCACTGACTCTGGCTCTGAC-۳′) و Reverse (۵′-ACCTCCTGCTCCTGTGGCT-۳′) و ۱۰۰ ng از DNA، یک توالی ۳۴۱ جفت بازی تولید شد. محصول PCR توسط FokI (Thermoscientific) در دمای ۳۷ °C برای چهار ساعت تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و سپس بر روی ژل آگارز جدا شد. در ژنوتیپ هموزیگوت FF یک باند ۳۴۱ جفت بازی (فقدان جایگاه برش در هر دو آلل)، در افراد واجد ژنوتیپ هموزیگوت ff دو باند ۲۸۲ و ۵۹ جفت بازی (وجود جایگاه برش در هر دو آلل) و در افراد Ff سه باند ۳۴۱، ۲۸۲ و ۵۹ جفت بازی (هتروزیگوت) وجود داشت.

آنالیزهای آماری: اطلاعات ژنتیکی و کلینیکی افراد مورد و شاهد توسط سیستم اینترنتی SISA (<http://www.quantitativeskills.com/sisa>) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمون χ^2 و Pearson برای بررسی وجود و یا عدم وجود تعادل هاردی-

هیچ کدام از این عوامل، ارتباط با هیچ ژنوتیپی نشان ندادند (داده‌ها ارایه نشده است). توزیع ژنوتیپ‌ها بر اساس مرحله‌بندی Hoehn & Yahr از پارکینسون آماده شد (جدول ۳). همان‌طور که در جدول ۳ آمده است، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف و مرحله‌ی پارکینسون مشاهده نشد.

نتایج ژنتیکی حاصل از RFLP-PCR شجره‌ی مورد نظر در جدول ۴ خلاصه شده است. بررسی ارتباط بین آلل‌ها و بروز بیماری پارکینسون نشان داد که آلل f قادر است تا ۴ برابر نرخ بروز بیماری پارکینسون را در این شجره افزایش دهد، اما این ارتباط معنی‌دار نبود ($OR = ۴/۰۹۱$ و $P = ۰/۲۲۰$). از طرف دیگر، بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و بروز بیماری پارکینسون نشان داد که افراد با ژنوتیپ ff برابر بیشتر به بیماری پارکینسون مبتلا شده‌اند ($OR = ۲/۶۶۷$ و $P = ۰/۴۵۰$)، اما این ارتباط نیز معنی‌دار نبود. معنی‌دار نبودن این ارتباط، ممکن است به دلیل تعداد کم داده‌ها (ناشی از کوچک بودن شجره) باشد (جدول ۱).

پارکینسون با آلل f مشاهده گردید، گرچه این ارتباط معنی‌دار نبود ($OR = ۱/۳$ ، $95\%CI: ۰/۴۳۷-۱/۲۸۳$ ، $P = ۰/۳۹۰$).

ارزیابی دیگر در مورد فراوانی و مقایسه‌ی ژنوتیپ‌های FokI می‌باشد که در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود، ژنوتیپ FF شایع‌ترین ترکیب آلی در بیماران بود ($۵۱/۷\%$ درصد). در حالی که در گروه شاهد، ژنوتیپ Ff از همه فراوان‌تر بود ($۵۱/۶\%$ درصد) و ژنوتیپ FF در رتبه‌ی دوم گروه شاهد بود ($۳۸/۷\%$ درصد). پایین‌ترین فراوانی گروه ژنوتیپی در گروه مورد و همچنین افراد شاهد، ترکیب ژنتیکی ff بود که با فراوانی ۱۰ درصد در هر دو گروه در جدول ۲ نشان داده شده است. مقایسه‌ی اولیه‌ی ژنوتیپ‌های FokI قادر به نشان دادن هیچ نوع رابطه‌ی معنی‌داری بین ژنوتیپ خاص و بیماری پارکینسون نبود (جدول ۲). اطلاعات بالینی بیماران پس از آن استفاده شد و ژنوتیپ در برابر جنس، سن، کلسیم، فسفر، آلکالین فسفاتاز، پاراتورمون و سطح ویتامین D^۳ تنظیم شد.

جدول ۱. فراوانی آلی در جایگاه FokI در بین افراد مورد و شاهد (طراحی A)

آلل	افراد شاهد n = ۶۲ تعداد (درصد)	افراد مورد n = ۶۰ تعداد (درصد)	CI %۹۵	مقدار P	(Odd ratio) OR
آلل F	۸۰ (۶۴/۵)	۸۵ (۷۰/۸)	۱/۲۸۰-۰/۴۴۰	۰/۲۹۱	۰/۷۴۹
آلل f	۴۴ (۳۵/۵)	۳۵ (۲۹/۲)	۰/۴۳۷-۱/۲۸۰	۰/۳۹۱	۱/۳۳۶
F/f in men vs F/f in women	۲۳/۱۱ vs ۶۳/۱۵		۰/۸۰۶-۵/۰۰۵	۰/۱۳۰	۲/۰۰۹

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ‌های FokI در گروه شاهد و گروه مورد (طراحی A)

ژنوتیپ	افراد شاهد n = ۶۲ تعداد (درصد)	افراد مورد n = ۶۰ تعداد (درصد)	CI %۹۵	مقدار P	(Odd ratio) OR
FF	۲۴ (۳۸/۷)	۰/۲۸۸-۱/۲۱۳	۳۱ (۵۱/۷)	۰/۱۵۰	۰/۵۹۱
Ff	۳۲ (۵۱/۶)	۰/۸۳۵-۳/۵۲۷	۲۳ (۳۸/۳)	۰/۱۴۰	۱/۷۱۶
ff	۶ (۹/۷)	۰/۲۹۳-۳/۱۷۵	۶ (۱۰/۰)	۱/۰۰۰	۰/۹۶۴

جدول ۳. ارتباط بین ژنوتیپ‌های FokI و شدت بیماری پارکینسون بر اساس مدل Hoehn & Yahr (طراحی A)

مقدار P	OR (مقدار P)	۹۵ CI %	مرحله‌بندی بیماری پارکینسون بر اساس مدل Hoehn & Yahr		ژنوتیپ بیماران
			مدل Hoehn & Yahr		
			۱-۱/۵	۲-۳	
۰/۵۴۱	۱/۴۲۹	۰/۴۵۳-۴/۵۰۱	۱۰	۲۰	FF
۰/۴۴۸	۰/۶۲۵	۰/۱۸۵-۲/۱۱۷	۵	۱۶	Ff
۰/۸۴۲	۱/۲۰۰	۰/۱۹۸-۷/۲۶۷	۲	۴	ff

هموزیگوت‌های ff نسبت به FF (۰/۲۱۱-۷۵/۶۶۰) ۹۵ CI: (OR = ۴ درصد و) دیده می‌شود. همچنین تمایل ۱/۲۵ برابری هموزیگوت‌های حامل آلل f نسبت حاملین دو آلل F، به داشتن سطح سرمی بیشتر از ۲۷ pg/ml از هورمون پاراتورمون (OR = ۱/۲۵ و ۹۵ CI: ۰/۰۶۸-۲۲/۸۸۰) نشان داده شد. مقایسه‌ی میزان سرمی ویتامین D نیز نتایج مشابهی نشان داد؛ چنانچه افراد ff ۱/۵ برابر افراد FF، سطح سرمی بیشتر از ۱۱۰ nmol/l نشان می‌دهند (OR = ۱/۵ و ۹۵ CI: ۰/۰۸۹-۲۵/۳۹۰) درصد و هر چند این نتایج نشان داد که افراد با ژنوتیپ ff نسبت به افراد هموزیگوت FF، به ترتیب ۴ و ۳ برابر سطوح فسفر و کلسیم سرمی کمتری دارند، اما این ارتباطها معنی‌دار نبود که ممکن است به دلیل تعداد کم داده‌ها باشد. همچنین بیماران با ژنوتیپ ff نسبت به بیماران با ژنوتیپ FF، سطوح سرمی بالاتری از آلکالین فسفاتاز، پاراتورمون و ویتامین D را نشان دادند، اما این ارتباطها نیز معنی‌دار نبود که ممکن است به دلیل تعداد کم داده‌ها باشد.

بحث

در این مطالعه، بررسی جایگاه چند شکلی FokI در ژن VDR مبتلایان به پارکینسون در ایران انجام شد. مقایسه‌ی آللی نشان می‌دهد که محافظت در برابر

جدول ۴. تعداد و درصد فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در افراد مورد

و افراد شاهد شجره (طراحی B)

ژنوتیپ	گروه مورد		گروه شاهد	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
FF	۵	۱۰۰	۷	۱۰۰
Ff	۰	۰	۰	۰
ff	۱	۲۰	۰	۰
مجموع آلل	۶	۱۰۰	۷	۱۰۰
F	۱۰	۱۰۰	۱۴	۱۰۰
f	۲	۳۳	۰	۰
مجموع	۱۲	۱۰۰	۱۴	۱۰۰

بررسی افراد بیمار در شجره نشان داد که بین سطوح برخی از عوامل سرمی خون مبتلایان به پارکینسون و ژنوتیپ این افراد، ارتباط‌های مشخصی وجود دارد. بررسی سرم خون بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون نشان داد که افراد با ژنوتیپ ff، ۴ برابر بیشتر از هموزیگوت‌های FF، سطح فسفر سرمی $\geq 3/6 \text{ mg/dl}$ دارند (OR = ۴ و ۹۵ CI: ۰/۲۱۱-۷۵/۶۶۰) درصد و همچنین، افراد با ژنوتیپ ff، ۳ برابر بیشتر از هموزیگوت‌های FF، سطح کلسیم $\geq 9/4 \text{ mg/dl}$ نشان می‌دهند (OR = ۳ و ۹۵ CI: ۰/۱۵-۵۹/۸۹) درصد و ۳ برابر بیشتر در

از طرف دیگر، مقایسه‌ی بیماران با ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد که سطح سرمی آلکالین فسفاتاز بالاتر از ۲۲۵ IU/L، تا ۳ برابر بیشتر در

FF دارای سطح بالاتری از آلکالین فسفاتاز، هورمون پاراتورمون و ویتامین D هستند.

از دیدگاه ژنتیکی، باید به این نکته توجه داشت که پلی مورفیسم FokI به عنوان یک نشانگر مستقل در ژن گیرنده‌ی ویتامین D عمل می‌کند؛ چرا که عدم تعادل پیوستگی (LD یا Linkage disequilibrium) این جایگاه با سایر نقاط پلی مورف بسیار کوچک است (۲۴). از این رو، بیشتر مطالعات به تنهایی بر روی این نقطه‌ی پلی مورف صورت می‌پذیرد.

نتیجه‌ی تحقیقات Arai و همکاران نشان داد که دو شکل پلی مورف در FokI از لحاظ عملکردی با هم اختلاف دارند. به عبارت دیگر، آلل F که همان فرم کوتاه‌تر پروتئین VDR (۴۲۴ اسید آمینه) است، نسبت به واریانت بلندتر یعنی آلل f (۴۲۷ اسید آمینه) فعال‌تر است (۲۴). Jurutka و همکاران نشان دادند که فرم ۴۲۴ اسید آمینه‌ای گیرنده‌ی ویتامین D به طور مؤثرتری با عامل رونویسی TFIIB میان‌کنش می‌دهد (۲۵). تحقیقات Colin و همکاران نشان داد که سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) یا Peripheral blood mononuclear cells (ED۵۰) در تیمار با PHA دارای دوز مؤثر پایین‌تری (۲۶) هستند و توانایی مهار رشد سلول را دارند (۲۶).

در مجموع، می‌توان گفت که فرم ۴۲۴ اسید آمینه‌ای گیرنده‌ی ویتامین D، فعال‌تر از فرم ۴۲۷ اسید آمینه‌ای است و در فرایند رونویسی ظرفیت بالایی به عنوان عامل رونویسی دارد (۲۴). شاید بتوان گفت که فعال‌تر بودن یا کاهش فعالیت گیرنده‌ی ویتامین D، بر اتصال ویتامین D تأثیرگذار است (۲۸). تنوع در اتصال ویتامین D با گیرنده‌اش بر مکانیسم‌هایی همچون سم‌زدایی، هومئوستازی کلسیم و بیان

پیشرفت پارکینسون زمانی وجود دارد که آلل F حضور داشته باشد. از سوی دیگر، حساسیت ناچیز به پارکینسون با آلل f در ارتباط بود. تجزیه و تحلیل ژنوتیپی نیز هیچ ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم FokI VDR و پارکینسون و نیز شدت (HY) پارکینسون نشان نمی‌دهد. این نتیجه، متناسب با یافته‌های قبلی در جمعیت‌های چینی (۱۷) و مجارستانی (۱۹) است. فراوانی پلی مورفیسم FokI نه تنها بین جامعه‌ی ما و جوامع مختلف متفاوت است، بلکه با دیگر کشورهای آسیایی نظیر ژاپن (۲۰) و هندیان شمالی (۲۱) نیز مغایرت دارد.

از آن جایی که بیماری پارکینسون یک بیماری چند عاملی محسوب می‌گردد، در جمعیت‌های مختلف، عوامل ژنتیکی متفاوتی در بروز آن نقش دارند. تا کنون چندین ژن، شناسایی شده‌اند که در فرم فامیلیال بیماری پارکینسون نقش دارند: از جمله این ژن‌ها، می‌توان به ژن SNCA، LRRK۲، PINK۱، PARK۷، PARK۲ و PARK۲ اشاره کرد که در فرم‌های اتوزومال غالب و اتوزومال مغلوب بیماری پارکینسون نقش دارند. اما تا کنون نقش ژن گیرنده‌ی ویتامین D در فرم فامیلیال پارکینسون مشخص نگردیده است (۲۲-۲۳).

در بررسی‌های مربوط به فرم فامیلیال نیز با وجود معنی‌دار نبودن ارتباط‌ها، مشخص شد که آلل f دارای ارتباط با بروز بیماری پارکینسون در این خانواده است؛ به طوری که افراد واجد ژنوتیپ ff حدود ۲/۷ برابر بیشتر از سایر افراد به این بیماری مبتلا شده‌اند (ارتباط معنی‌دار نبود). در آنالیزهای بیوشیمیایی نیز مشخص شد که افراد واجد ژنوتیپ ff در مقایسه با افراد FF با کاهش سطح سرمی فسفر و کلسیم ارتباط دارند. از طرفی، افراد هموزیگوت ff نسبت به افراد

شروع بیماری پارکینسون با پلی مورفیسیم‌های ژن گیرنده‌ی ویتامین D ارتباط وجود دارد (۳۱، ۱۶). به منظور کاربردی بودن این نتایج، لازم است که اندازه‌ی جمعیت مورد مطالعه بزرگ باشد. همچنین سایر پلی مورفیسیم‌های ژن VDR یعنی ApaI، TaqI و BsmI نیز بررسی گردد.

تشریح و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۴۷۹ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) می‌باشد. بدین وسیله از همکاری استادان محترم مرکز تحقیقات علوم اعصاب بیمارستان الزهرا (س) و کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) قدردانی می‌گردد.

نوتروفین‌ها مؤثر واقع می‌شود که خود این فرایندها نیز باعث پیری نورون‌ها، آسیب‌های نورونی و تحلیل نورون‌ها می‌گردد (۲۹).

بر اساس مطالعه‌ی قبل (۳۰) و پژوهش حاضر، مشخص شد که بین آلل F و سطح بالای سرمی ویتامین D و خطر پایین ابتلا به پارکینسون، ارتباط وجود دارد؛ گرچه این ارتباط معنی‌دار نبود. اما در مطالعه‌ی Han و همکاران، آلل F به عنوان یک عامل خطر برای ابتلا به پارکینسون در نظر گرفته شد (۱۷). بر اساس تحقیقات Suzuki و همکاران در جمعیت ژاپن، وجود ارتباط بین ژنوتیپ FF و فرم خفیف پارکینسون گزارش شد (۱۱). در سال‌های اخیر، بررسی‌های GWAS (Genome-wide association study) مشخص شده است که در جمعیت قفقازی‌ها، بین خطر ابتلا و سن

References

- Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* 2007; 68(5): 326-37.
- Gardner KL. Genetics of migraine: an update. *Headache* 2006; 46(Suppl 1): S19-S24.
- Lozano AM, Lang AE, Hutchison WD, Dostrovsky JO. New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8(6): 783-90.
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53(Suppl 3): S26-S36.
- Wullner U, Klockgether T. Inflammation in Parkinson's disease. *J Neurol* 2003; 250 Suppl 1: I35-I38.
- Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death Differ* 2007; 14(7): 1261-6.
- Vieregge P, von MC, Friedrich HJ. Life-style and dietary factors early and late in Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* 1992; 19(2): 170-3.
- Hellenbrand W, Boeig H, Robra BP, Seidler A, Vieregge P, Nischan P, et al. Diet and Parkinson's disease. II: A possible role for the past intake of specific nutrients. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case-control study. *Neurology* 1996; 47(3): 644-50.
- de Lau LM, Schipper CM, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 2005; 62(8): 1265-9.
- Knekt P, Kilkkinen A, Rissanen H, Marniemi J, Saaksjarvi K, Heliovaara M. Serum vitamin D and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2010; 67(7): 808-11.
- Suzuki M, Yoshioka M, Hashimoto M, Murakami M, Kawasaki K, Noya M, et al. 25-hydroxyvitamin D, vitamin D receptor gene polymorphisms, and severity of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27(2): 264-71.
- Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *J Bone*

- Miner Res 1998; 13(11): 1691-9.
13. Chitsaz A, Maracy M, Basiri K, Izadi BM, Tanhaei AP, Rahimi M, et al. 25-hydroxyvitamin d and severity of Parkinson's disease. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 689149.
 14. Calle C, Maestro B, Garcia-Arencibia M. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 65.
 15. Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine AP, Simell O, Knip M, et al. Vitamin D receptor polymorphism: not association with type 1 in the Finnish population. *Eur J Endocrinol* 2003; 149: 591-6.
 16. Butler MW, Burt A, Edwards TL, Zuchner S, Scott WK, Martin ER, et al. Vitamin D receptor gene as a candidate gene for Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 2011; 75(2): 201-10.
 17. Han X, Xue L, Li Y, Chen B, Xie A. Vitamin D receptor gene polymorphism and its association with Parkinson's disease in Chinese Han population. *Neurosci Lett* 2012; 525(1): 29-33.
 18. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. *Neurology* 2001; 57(10 Suppl 3): S11-S26.
 19. Torok R, Torok N, Szalardy L, Plangar I, Szolnoki Z, Somogyvari F, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and Parkinson's disease in Hungarians. *Neurosci Lett* 2013; 551: 70-4.
 20. Minamitani K, Takahashi Y, Minagawa M, Yasuda T, Niimi H. Difference in height associated with a translation start site polymorphism in the vitamin D receptor gene. *Pediatr Res* 1998; 44(5): 628-32.
 21. Bid HK, Mishra DK, Mittal RD. Vitamin-D receptor (VDR) gene (Fok-I, Taq-I and Apa-I) polymorphisms in healthy individuals from north Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6(2): 147-52.
 22. Xu C, Xu J, Zhang Y, Ma J, Kawakami H, Maruyama H, et al. Analysis on the susceptibility genes in two chinese pedigrees with familial Parkinson's disease. *Neurol Res Int* 2010; 2010: 674740.
 23. Camargos ST, Dornas LO, Momeni P, Lees A, Hardy J, Singleton A, et al. Familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease in a Brazilian movement disorders clinic: phenotypic characterization and frequency of SNCA, PRKN, PINK1, and LRRK2 mutations. *Mov Disord* 2009; 24(5): 662-6.
 24. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338(2): 143-56.
 25. Arai H, Miyamoto K, 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.
 26. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* 2000; 14(3): 401-20.
 27. Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Buurman CJ, Birkenhager JC, Pols HA, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 52(2): 211-6.
 28. Cai Q, Chandler JS, Wasserman RH, Kumar R, Penniston JT. Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(4): 1345-9.
 29. Gezen-Ak D, Dursun E, Ertan T, Hanagasi H, Gurvit H, Emre M, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med* 2007; 212(3): 275-82.
 30. Mostowska A, Lianeri M, Wudarski M, Olesinska M, Jagodzinski PP. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 2013; 40(2): 803-10.
 31. Cannell JJ. Autism and vitamin D. *Med Hypotheses* 2008; 70(4): 750-9.

Association of Vitamin D Receptor Genotypes in Sporadic and Familial Parkinson's Disease

Maryam Ostadsharif PhD¹, Rokhsareh Meamar MD, PhD², Mojgan Asadian MD³,
Maryam Izadi⁴, Morteza Javadi-Rad MSc⁵, Ahmad Chitsaz MD⁶

Original Article

Abstract

Background: The association of vitamin D and Parkinson's disease (PD) has recently been proposed which acts via vitamin D receptor (VDR). The vitamin D receptor gene contains a start codon polymorphism that can be detected with the restriction enzyme FokI. The aim of this study was to identify the association of FokI polymorphism in sporadic and familial form of Parkinson's disease.

Methods: In present case-control study, blood samples were collected from 60 patients with Parkinson's disease in local Isfahan population (Iran) and 62 unrelated normal individuals from southwest region of Isfahan. Another part of the study was planned on evaluation of 6 patients with Parkinson's disease and 7 healthy controls from one family with the Parkinson's disease pedigree. The polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method used to determine genotypes. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25OHD), parathyroid hormone, calcium, phosphorus and alkaline phosphatase from patients and controls of pedigree were analyzed.

Findings: In sporadic Parkinson's disease, protection against the development of the disease was conferred when F allele existed, but it was not significant (OR = 0.7, 95%CI: 0.44-1.28, P = 0.29). On the other hand, insignificant susceptibility to Parkinson's disease was correlated to f allele (OR = 1.3, 95%CI: 0.437-1.283, P = 0.39). In familial study, that the risk ratio of Parkinson's disease in the sample was 4 folds higher for f allele (OR = 4.091, 95%CI: 0.374-44.788, P = 0.22); whereas, ff homozygosity for the FokI genotype was a non-significant genetic risk factor (2.7 times) for Parkinson's disease compared with other FokI genotypes (OR = 2.667, 95%CI: 0.193-36.756, P = 0.45). Patients with ff genotype compared with FF ones showed increased serum level of 25OHD, parathyroid hormone and alkaline phosphatase, but the associations were not significant.

Conclusion: Our finding focused on FokI polymorphism alone, and then we need to analyze other polymorphisms in the vitamin D receptor gene, such as ApaI, TaqI and BsmI. Because of small population of the study, generalizing these results might be limited.

Keywords: Parkinson's disease, Vitamin D receptor, Sporadic form, Familial form

Citation: Ostadsharif M, Meamar R, Asadian M, Izadi M, Javadi-Rad M, Chitsaz A, et al. Association of Vitamin D Receptor Genotypes in Sporadic and Familial Parkinson's Disease. J Isfahan Med Sch 2014; 32(305): 1718-27

1- Assistant Professor, Department of Medical Basic Sciences, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Isfahan Neurosciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences AND Department of Medical Sciences, Islamic Azad University, Najafabad Branch, Isfahan, Iran
3- Neurologist, Isfahan Steel Company, Isfahan, Iran
4- Student of Medicine, Islamic Azad University, Najafabad Branch, Isfahan, Iran
5- PhD Student, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
6- Professor, Department of Neurology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Maryam Ostadsharif PhD, Email: m.ostadsharif@khuisf.ac.ir