مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸۰/هفته‌ی چهارم خرداد ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۰

بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم ژن استئوپونتین (rs28357094 T>G) و ژن گیرنده‌ی آن ITGA4 (rs1449263 A>G) در افراد مبتلا به Multiple Sclerosis در مقایسه با افراد سالم جمعیت اصفهان

فهیمه دادخواه[۱]، فرشته آل‌صاحب فصول[۲]، ناهید اسکندری[۲]، منصور صالحی[۳]، مسعود اعتمادی‌فر[۴]، محمد کاظمی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Multiple sclerosis (MS) یک بیماری خود ایمنی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که عوامل مختلف ژنتیک و محیطی در شیوع آن نقش دارند. با توجه به نقش استئوپونتین (OPN یا Osteopontin) و گیرنده‌ی آن (ITGA4 یا Integrins alpha-4/beta-1) در پاسخ‌های ایمنی، ژن‌های کد کننده‌ی استئوپونتین و ITGA4 می‌توانند به عنوان عواملی جهت بررسی استعداد ابتلا به بیماری MS در نظر گرفته شوند. در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی پلی‌مورفیسم (rs28357094 T>G) در ژن OPN و پلی‌مورفیسم (rs1449263 A>G) در ژن ITGA4 در افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: از ۱۰۰ بیمار مبتلا به MS در استان اصفهان به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد نمونه‌گیری خون انجام شد. ژنوتایپ‌های rs28357094 ژن OPN و rs1449263 ژن ITGA4 از DNA استخراج شد و با استفاده از تکنیک High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM real time PCR) مورد بررسی قرار گرفت. بررسی آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، فراوانی ژنوتایپ TT (OPN-rs28357094) (P = ۰/۰۲۰، OR = ۱/۸۵ یا Odd ratio) و همچنین فراوانی ژنوتایپ AA (ITGA4-rs1449263) (P = ۰/۰۱۲، OR = ۲/۱۰) در افراد مبتلا به MS به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم بود.

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم ژن OPN (rs28357094) و ژن ITGA4 (rs1449263) با استعداد ابتلا به بیماری MS در جمعیت اصفهان مرتبط است.

واژگان کلیدی: Multiple sclerosis، پلی‌مورفیسم، ژن استئوپونتین، ژن ITGA4

ارجاع: دادخواه فهیمه، آل‌صاحب فصول فرشته، اسکندری ناهید، صالحی منصور، اعتمادی‌فر مسعود، کاظمی محمد. **بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم ژن استئوپونتین (rs28357094 T>G) و ژن گیرنده‌ی آن ITGA4 (rs1449263 A>G) در افراد مبتلا به Multiple Sclerosis در مقایسه با افراد سالم جمعیت اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۰): ۴۲۹-۴۲۲

مقدمه

Multiple sclerosis (MS) یک بیماری خود ایمن مزمن و پیچیده است‌که با التهاب، دمیلینه شدن و تخریب آکسون‌ها در سیستم عصبی مرکزی (CNS یا Central nervous system) مشخص می‌شود و با حمله به غلاف میلین سلول‌های عصبی، منجر به آسیب نورون‌ها می‌شود (۱). بیشتر از دو میلیون نفر در جهان از این بیماری رنج می‌برند (۲). این بیماری، به طور عمده بزرگسالان جوان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و وقوع آن در زنان ۳-۲ برابر مردان است. بنا بر آخرین آمار، شیوع بیماری در ایران ۶۰-۲۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر و در استان اصفهان به میزان ۷۳/۳ در ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد (۳). اتیولوژی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استاد، گروه مغز و اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- دانشجوی دکتری،گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فرشته آل‌صاحب فصول
Email: alsahebfosoul@med.mui.ac.ir

بیماری MS نامشخص است، اما عقیده بر این است که این بیماری، از تعامل پیچیده بین عوامل ژنتیک و عوامل محیطی تأثیر می‌پذیرد (۴). شماری از گونه‌های ژنتیک به عنوان عوامل افزایش دهنده‌ی خطر ابتلا به بیماری شناخته شده‌اند (۵).

Osteopontin (OPN)، یک سیتوکاین پیش‌التهابی است که توسط سلول‌های ایمنی شامل نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، ماست سل‌ها و لنفوسیت‌های B و به ویژه لنفوسیت‌های T، ماکروفاژها و سلول‌های Natural killer (NK) تولید می‌شود. این سایتوکاین، نقش مهمی در ترمیم بافت‌ها، فیبروزیس، تنظیم ایمنی، التهاب و متاستاز دارد (۷-۶). مطالعات نشان داده است که OPN در بیماری MS نقش دارد و منجر به افزایش پاسخ‌های پیش‌التهابی سلول‌های T helper1 (Th1) و Th17 و مهار پاسخ سلول‌های Th2 می‌شود که بر پیشرفت بیماری تأثیر می‌گذارد (۱۲-۸). نقش OPN از طریق القای تولید Interleukin12 (IL12) و مهار تولید IL10 ایفا می‌شود (۱۳). در طول التهاب، OPN چسبندگی و فراخوانی نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های T را از طریق باند شدن به اینتگرین‌های β_1 و انواعی از گیرنده‌های اسید هیالورونیک CD44 تنظیم می‌کند (۱۵-۱۴).

اینتگرین $\alpha_4\beta_1$ (ITGA4 یا Integrins alpha-4/beta-1) گیرنده‌ی استئوپونتین که به عنوان Very late antigen-4 (VLA4) هم نام برده می‌شود، یک مولکول چسبنده است که توسط سلول‌های T بیان و باعث ورود سلول‌های اجرایی به داخل مغز می‌شود. VCAM1 (Vascular cell adhesion molecule 1) و OPN لیگاندهای مربوط به اینتگرین هستند که بر روی اندوتلیوم ملتهب مغز در ماتریکس خارج سلولی حاشیه‌ی عروق بیان می‌شوند. در اثر اتصال اینتگرین با لیگاندهای مربوط، سلول‌های T از طریق دیاپدز و مهاجرت از بین سلول‌های اندوتلیوم وارد CNS می‌شوند. اتصال OPN به ITGA4 منجر به افزایش بیان ژن‌های حیاتی و ژن‌های سیتوکاین‌های سلول‌های Th1 و Th17 می‌شود. در مغز، ترشح سیتوکاین‌ها از قبیل OPN توسط لنفوسیت‌های T و سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن به الیگودندروسیت‌ها که تولید کننده‌ی میلین هستند، آسیب می‌زند (۱۷-۱۶).

ژن OPN انسانی یا فسفوپروتئین ۱ ترشحی (SPP1 یا Secreted phosphoprotein 1) بر روی کروموزوم ۴ قرار گرفته است و بعضی از پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs یا Single nucleotide polymorphisms) آن با توسعه، فعالیت بیماری و یا هر دو، در چندین بیماری خود ایمنی مرتبط هستند (۲۱-۱۸). اختلاف در بیان OPN ممکن است به علت وجود گونه‌هایی در منطقه‌ی پروموتر ژن OPN باشد که فعالیت ترجمه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این نقش، برای G>T-66، GG>G -156 و T>C-443 پیشنهاد شده است. نتایج بیانگر آن است که وجود SNP مورد نظردر موقعیت 66- تا ۵۰ درصد فعالیت پروموتر را کاهش می‌دهد (۲۲).

ITGA4 بر روی کروموزوم 2 قرار گرفته است و نتایج تحقیق O'Doherty و همکاران حاکی از آن است که آلل C پلی‌مورفیسم rs1449263 C/T در پروموتر ژن ITGA4 در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشته است (۲۳).

با توجه به شیوع بالای بیماری MS در استان اصفهان و تفاوت عوامل ژنتیک، نژادی و محیطی همچون عرض جغرافیایی، میزان در معرض بودن نور خورشید (سطح ویتامین D) در کشورها و مناطق مختلف جهان، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی پلی‌مورفیسم rs28357094 در پروموتر ژن OPN و پلی‌مورفیسم rs1449263 در پروموتر ژن ITGA4 در بیماران مبتلا به RRMS (Relapsing-remitting multiple sclerosis) در مقایسه با گروه شاهد سالم انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، ۱۰۰ بیمار مبتلا به RRMS که بیماری آن‌ها به تأیید متخصص مغز و اعصاب رسیده بود، به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ نفر از افراد سالم مراجعه کننده به سازمان انتقال خون اصفهان، بدون سابقه‌ی بیماری التهابی که از نظر سن و نژاد با بیماران سازگار بودند، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. این مطالعه، توسط کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأیید شده و از همه‌ی افراد رضایت‌نامه‌ی کتبی اخذ گردید.

نمونه‌گیری و استخراج DNA: از هر فرد به مقدار ۲ سی‌سی خون در لوله‌های حاوی Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) جمع‌آوری شد. DNA از نمونه‌ی خون طبق دستورالعمل کیت استخراج DNA (شرکت Genet Bio-Korea) استخراج شد. کمیت DNA استخراج شده با اندازه‌گیری چگالی نوری (OD یا Optical density) آن در ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر و کیفیت آن با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد بررسی شد.

تعیین ژنوتایپ: در این تحقیق، پلی‌مورفیسم (-66T>G) rs28357094 در پروموتر ژن OPN و (rs1449263 A>G) در پروموتر ژن گیرنده‌ی استئوپونتین (ITGA4) با روش High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM real time PCR) بررسی شد. توالی پرایمرهای هر دو ژن توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی و جهت سنتز ارسال شد (Macrogene; Korea) (جدول ۱).

جهت انجام چرخه‌ی PCR و آنالیز HRM از دستگاه و نرم‌افزار

جدول ۱. توالی پرایمرهای مربوط به پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه

Gene	SNP	Location	Allele	Product Size (bp)	Primer
OPN	rs:28357094	Promoter	T →G	248	F:5'-AAAACCAGAGGGGGAAGTGT-3' R:5'-CCCAGTAGCAAACTGAAGCTG-3'
ITGA4	rs:1449263	Promoter	G →A	236	F:5'-TGCCCACTATATGCCAAAAA-3' R:5'-GGAAACTCAGAGTGGCCAGA-3'

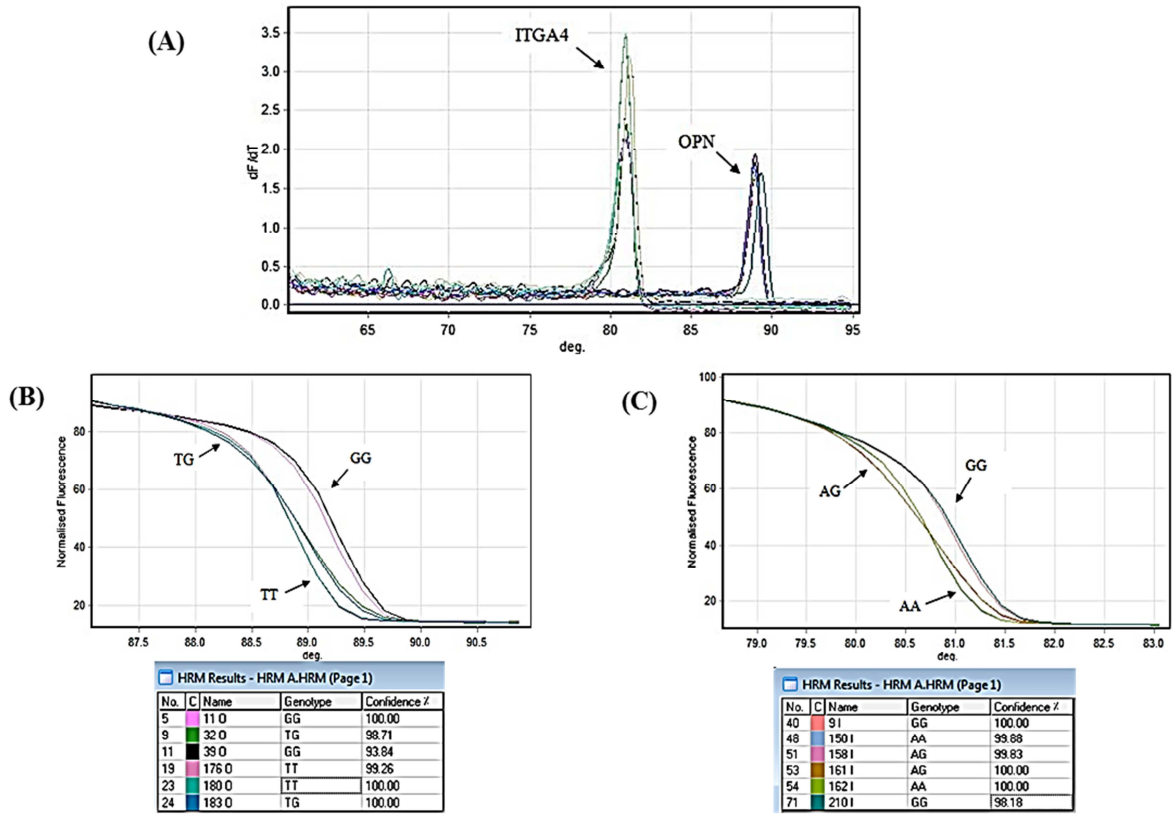
OPN: Osteopontin; ITGA4: Integrins alpha-4/beta-1; SNP: Single nucleotide polymorphisms

HRM real time PCR و کیت Corbett (Rotor-Gene6000) (Solis Bio Dyne company-Estonia) استفاده شد.

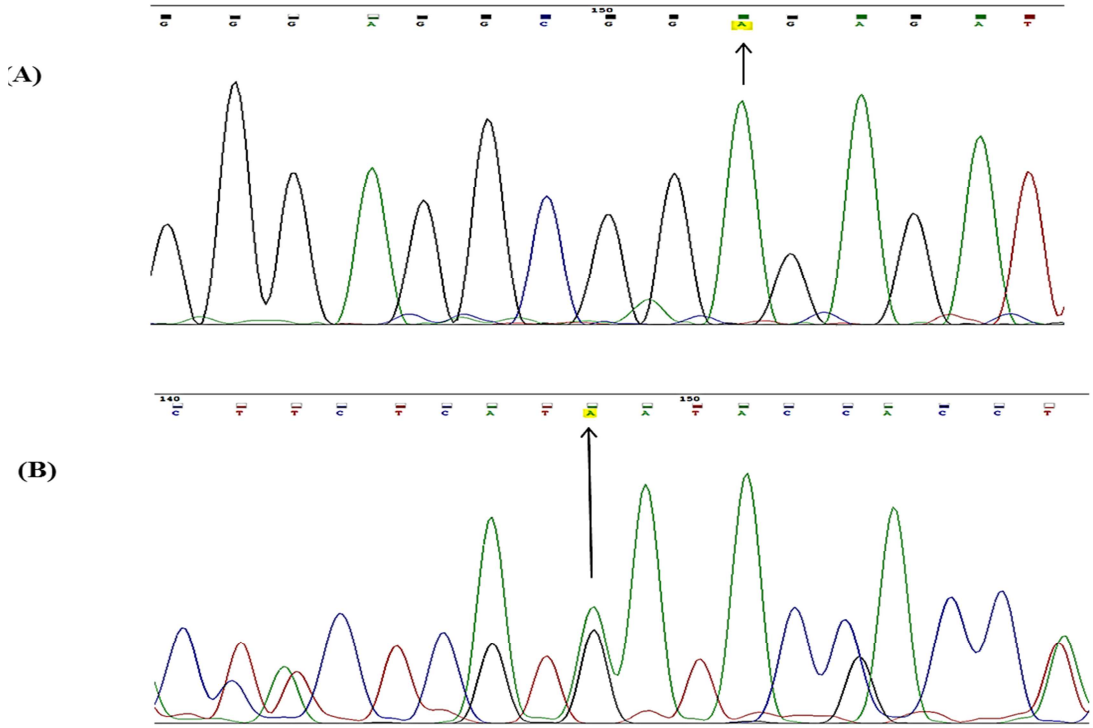
واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر از MasterMix5x (DNA پلیمراز، Deoxynucleoside triphosphate یا dNTP، $MgCl_2$، رنگ فلورسنت اواگرین)، ۰/۱ میکرولیتر پرایمر Forward (۱۰ پیکومول)، ۰/۱ میکرولیتر پرایمر Reverse (۱۰ پیکومول)، ۵/۸ میکرولیتر H_2O و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده انجام شد.

چرخه‌ی PCR به صورت یک مرحله‌ی فعال‌سازی اولی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس، ۴۰ چرخه (شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، گسترش ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و در نهایت مرحله‌ی ذوب (شکل ۱–A) از ۹۵–۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با افزایش ۰/۲ درجه بر ثانیه اجرا شد.

جهت مشاهده‌ی باند ژن‌های مورد نظر و اطمینان از صحت انجام PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. همچنین، درصدی از نمونه‌ها جهت تعیین توالی فرستاده شد (Bioneer; Korea) (شکل ۲).



شکل ۱. A: منحنی ذوب پلی‌مورفیسم rs28357094 T>G ژن Osteopontin (OPN) و rs1449263 A>G ژن Integrins alpha-4/beta-1 (ITGA4) به روش High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM real time PCR)، B: منحنی‌های نرمالیزه شده‌ی سه ژنوتایپ پلی‌مورفیسم rs28357094 T>G ژن OPN در نمونه‌های مختلف، C: منحنی‌های نرمالیزه شده‌ی سه ژنوتایپ پلی‌مورفیسم rs1449263 A>G ژن ITGA4 در نمونه‌های مختلف. محور افقی، درجه‌ی حرارت و محور عمودی، شدت نور فلورسانس را نشان می‌دهد.



شکل ۲. A: نتیجه‌ی Sequencing پلی‌مورفیسم rs28357094 T>G هموزیگوت TT ژن Osteopontin (OPN) با استفاده از پرایمر Reverse، B: نتیجه‌ی Sequencing پلی‌مورفیسم rs1449263 A>G هتروزیگوت AG ژن Integrins alpha-4/beta-1 (ITGA4) با استفاده از پرایمر Forward

در این مطالعه، از آزمون‌های Independent t جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها و آزمون χ^2 برای مقایسه‌ی فراوانی آلل و توزیع ژنوتایپ بین گروه مورد و شاهد استفاده شد. ارتباط همبستگی پلی‌مورفیسم ژن OPN و ژن ITGA4 با بیماری MS با اندازه‌گیری تخمین شانس خطر ابتلا (OR یا Odd ratio) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (۹۵ درصد = CI) مورد بررسی قرار گرفت. جهت کنترل اثر مخدوشگر ناهمگنی توزیع جنس در دو گروه، از آزمون Mantel-Haenszel استفاده شد. معادله‌ی Hardy–Weinberg با استفاده از آزمون χ^2 مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) جهت بررسی آماری مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

در این پژوهش، ۱۰۰ بیمار مبتلا به MS (گروه مورد) و ۱۰۰ فرد سالم (گروه شاهد) مورد مطالعه قرارگرفتند. اطلاعات توصیفی هر دو گروه در جدول ۲ آمده است. آزمون Independent t، تفاوت قابل توجهی بین میانگین سن افراد در دو گروه نشان نداد (P = ۰/۲۷۰).

جدول ۲. اطلاعات توصیفی گروه‌های مورد مطالعه

متغیر		گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P
سن (میانگین ± انحراف معیار)		۸/۸ ± ۳۱/۳	۸/۳ ± ۳۲/۶	۰/۲۷۰
جنس	مرد	۱۹ (۱۹)	۶۵ (۶۵)	۰/۰۰۱
	زن	۸۱ (۸۱)	۳۵ (۳۵)	
EDSS	۱	۹۰ (۹۰)	–	–
	۱/۵	۶ (۶)	–	–
	۲	۳ (۳)	–	–
	۳	۱ (۱)	–	–
جمع کل		۱۰۰ (۱۰۰)	۱۰۰ (۱۰۰)	

EDSS: Expanded disability status score

جدول ۳. نتایج High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM-Real Time PCR) پلی مورفیسم rs28357094 T>G ژن Osteopontin (OPN) در دو گروه

متغیر		گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P	OR (CI = ٪۹۵)
فراوانی ژنوتایپ	TT	۷۱ (۷۱/۰)	۵۷ (۵۷/۰)	–	Reference
	TG	۲۶ (۲۶/۰)	۳۹ (۳۹/۰)	۰/۰۴۰	OR = ۰/۵۳ (۰/۲۹–۰/۹۸)
	GG	۳ (۳/۰)	۴ (۴/۰)	۰/۵۱۰	OR = ۰/۶۰ (۰/۱۲–۲/۸۰)
	TT	۷۱ (۷۱/۰)	۵۷ (۵۷/۰)	۰/۰۲۰	OR = ۱/۸۵ (۱/۰۳–۳/۳۲)
	TG + GG	۲۹ (۲۹/۰)	۴۳ (۴۳/۰)	–	
فراوانی آلل	T	۱۶۸ (۸۴/۰)	۱۵۳ (۷۶/۵)	۰/۰۶۰	OR = ۱/۶۱ (۰/۹۷–۲/۶۶)
	G	۳۲ (۱۶/۰)	۴۷ (۲۳/۵)		

CI: Confidence interval; OR: Odd ratio

توزیع ژنوتایپ در دو گروه مورد و شاهد با معادله‌ی Hardy- Weinberg سازگاری داشت.

آزمون χ^2 نشان داد که توزیع فراوانی پلی‌مورفیسم rs28357094 T>G (در ژن OPN) در دو گروه مورد و شاهد متفاوت بود. توزیع فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت TT در افراد گروه مورد، به طور معنی‌داری بیشتر از افراد گروه شاهد بود (P = ۰/۰۲۰)؛ به گونه‌ای که این افراد، حدود ۲ برابر بیشتر شانس ابتلا به بیماری MS را نسبت به افراد فاقد این ژنوتایپ داشتند (OR = ۱/۸۵۰). همچنین، فراوانی آلل T در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد بود (OR = ۱/۶۱۰)؛ هر چند این اختلاف معنی‌دار نبود (P = ۰/۰۶۰). نتایج نشان داد که پلی‌مورفیسم مورد نظر در ژن OPN، ممکن است با استعداد ابتلا به بیماری MS در ارتباط باشد (جدول ۳) (شکل ۱–B).

نتایج آزمون χ^2 نشان داد که توزیع فراوانی پلی‌مورفیسم rs1449263 (در ژن ITGA4) در دو گروه مورد مطالعه، متفاوت بود. توزیع فراوانی ژنوتایپ هموزیگوت AA در افراد بیمار به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم بود (P = ۰/۰۱۲)؛ به طوری که حدود ۲ برابر بیشتر شانس ابتلا به بیماری MS را نسبت به افراد فاقد این ژنوتایپ داشتند (OR = ۲/۱۰۰). فراوانی آلل A در گروه مورد بیشتر از گروه سالم بود (OR = ۱/۳۵۰)؛ هر چند این اختلاف معنی‌دار نبود (P = ۰/۱۳۰). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ممکن است پلی‌مورفیسم مورد نظر در ژن ITGA4 با استعداد ابتلا به بیماری MS در ارتباط باشد (جدول ۴) (شکل ۱–C).

آزمون Mantel-Haenszel نشان داد که اگر توزیع جنس در هر دو گروه یکسان بود، باز هم فراوانی ژنوتایپ در بین دو گروه معنی‌دار می‌شد. بنا بر این، در مطالعه‌ی حاضر، ناهمگن بودن جنس نمی‌تواند به عنوان متغیر مخدوشگر عمل کند.

جدول ۴. نتایج High resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM real time PCR) پلی‌مورفیسم rs1449263 در ژن Integrins alpha-4/beta-1 (ITGA4) در دو گروه

متغیر		گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	مقدار P	OR (CI = ٪۹۵)
فراوانی ژنوتایپ	AA	۳۳ (۳۳/۰)	۱۹ (۱۹/۰)	–	Reference
	AG	۳۶ (۳۶/۰)	۴۹ (۴۹/۰)	۰/۰۱۶	OR = ۰/۴۲ (۰/۲۰–۰/۸۶)
	GG	۳۱ (۳۱/۰)	۳۲ (۳۲/۰)	۰/۱۳۰	OR = ۰/۵۵ (۰/۲۶–۱/۱۸)
	AA	۳۳ (۳۳/۰)	۱۹ (۱۹/۰)	۰/۰۱۲	OR = ۲/۰۱ (۱/۰۹–۴/۰۲)
	AG + GG	۶۷ (۶۷/۰)	۸۱ (۸۱/۰)		
فراوانی آلل	A	۱۰۲ (۵۱/۰)	۸۷ (۴۳/۵)	۰/۱۳۰	OR = ۱/۳۵ (۰/۹۱–۲/۰۰)
	G	۹۸ (۴۹/۰)	۱۱۳ (۵۶/۵)		

CI: Confidence interval; OR: Odd ratio

بحث

نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تعادل Th1/Th2 در تحریک و تنظیم پاسخ‌های‌ایمنی نقش دارد (۲۴). همچنین، سلول‌های Th1 و Th17 نقش مهمی در ایمنوپاتوژنز بیماری MS ایفا می‌کنند (۲۵). استئوپونتین در سلول‌های Th1 بیشتر از سلول‌های Th2 بیان می‌شود (۲۶). اتصال OPN به ITGA4، منجر به افزایش بیان ژن سیتوکاین‌های سلول‌های Th1 و Th17 می‌شود. با توجه به نقش استئوپونتین و گیرنده‌ی آن (ITGA4) در پاسخ‌های ایمنی و التهاب، ژن‌های کد کننده‌ی استئوپونتین و ITGA4 می‌توانند به عنوان عواملی برای بررسی استعداد ابتلا به بیماری MS در نظر گرفته شوند (۱۷).

اختلاف در بیان OPN، ممکن است به علت وجود گونه‌های متنوع در منطقه‌ی پروموتر ژن OPN باشد که فعالیت ترجمه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این نقش، برای T>G -66، G>GG -156 و C>T -443 پیشنهاد شده است (۲۲).

در این مطالعه، فراوانی ژنوتایپ‌های پلی‌مورفیسم (-66) rs28357094 T>G در ژن OPN در بیماران مبتلا به بیماری MS (گروه مورد) استان اصفهان در مقایسه با افراد سالم (گروه شاهد) و همچنین ارتباط آن با استعداد ابتلا به این بیماری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که فراوانی ژنوتایپ TT در افراد گروه مورد بیشتر از افراد گروه شاهد بوده و رابطه‌ی معنی‌داری بین ژنوتایپ TT و استعداد ابتلا به این بیماری وجود داشته است. بر اساس جستجوهای انجام شده در پایگاه‌های معتبر علمی، مطالعاتی در مورد ارتباط این پلی‌مورفیسم با سایر بیماری‌های خود ایمن مشابه با مکانیسم ایمونولوژی بیماری MS از قبیل دیابت نوع ۱ و لوپوس اریتماتوز (Systemic lupus erythematosus یا SLE) انجام شده است (۲۸-۲۷). در حالی که هیچ مطالعه‌ی مورد- شاهدی مبنی بر همبستگی میان rs28357094 T>G در ژن OPN با بیماری MS گزارش نشده است.

مطالعه‌ی انجام شده توسط Giacopelli و همکاران نشان داده است که پلی‌مورفیسم ژن OPN در موقعیت (-66) rs28357094 T>G، Affinity اتصال به عوامل نسخه‌برداری SP1/SP3 را تغییر می‌دهد. عوامل پیش‌گفته، این جایگاه را تشخیص می‌دهند و آلل T در توالی تشخیصی SP1 میل پیوندی بالاتری برای اتصال به این عامل دارد؛ بنا بر نتایج این تحقیق، وجود این SNP (جایگزینی آلل T با G) در این ناحیه تا ۵۰ درصد فعالیت پروموتر را کاهش می‌دهد (۲۲).

علاوه بر این، مطالعه‌ی دیگری توسط Hummelshoj و همکاران نیز نشان داده است که عامل ترجمه‌ی SP1 به آلل T متصل می‌شود؛ از این رو، جایگزینی آلل T با G، می‌تواند در بیان استئوپونتین نقش داشته باشد (۲۹). با توجه به این که استئوپونتین در تعادل بین Th1/Th2 نقش دارد، وجود پلی‌مورفیسم در موقعیت -66 ممکن است با پاسخ‌های Th1/Th2 و بیماری‌های خود ایمن از جمله MS مرتبط باشد.

بررسی نتایج مطالعه‌ی حاضر مبنی بر افزایش ژنوتایپ TT افراد گروه مورد در مقایسه با افراد گروه شاهد و مطالعات پیش‌گفته، نشان می‌دهد که ممکن است وجود ژنوتایپ TT احتمال ابتلا به بیماری MS را افزایش دهد و بدین ترتیب، این پلی‌مورفیسم با بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه مرتبط باشد.

با توجه به نقش اینتگرین $4\beta1\alpha$ (ITGA4) گیرنده‌ی استئوپونتین، در ورود سلول‌های اجرایی به داخل مغز، این بخش از مطالعه به بررسی فراوانی ژنوتایپ‌های پلی‌مورفیسم rs1449263 A>G در ژن ITGA4 در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد و ارتباط آن با استعداد ابتلا به این بیماری در جمعیت اصفهان پرداخته است. نتایج این مطالعه، نشان داد که فراوانی ژنوتایپ AA در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد سالم می‌باشد و ارتباط معنی‌داری بین ژنوتایپ AA و استعداد ابتلا به این بیماری وجود دارد. بنا بر این، ممکن است این پلی‌مورفیسم، با استعداد ابتلا به بیماری MS مرتبط باشد. گر چه نتایج مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌ی O'Doherty و همکاران در مورد ارتباط پلی‌مورفیسم rs1449263 C/T در ژن ITGA4 با بیماری MS همسویی ندارد (۲۳)، این تناقض ممکن است به دلیل تفاوت‌های نژادی، تفاوت‌های ژنتیک، تفاوت در عوامل محیطی (عرض جغرافیایی) و میزان مواجهه با نور خورشید باشد.

به نظر می‌رسد تحقیق حاضر، بیانگر ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های rs28357094 T>G در ژن OPN و rs1449263 A>G در ژن ITGA4 با بیماری MS در جمعیت مورد مطالعه باشد؛ البته پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی دقیق‌تر نقش این ژن‌ها در بروز بیماری MS، مطالعات آینده با حجم نمونه‌ی بیشتر انجام گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد فهیمه دادخواه (با کد پژوهشی ۳۹۳۷۸۴) می‌باشد که توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد حمایت مالی قرار گرفته است. لازم است از تمامی کسانی که ما را در این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی نماییم.

References

1. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. Clin Immunol 2012; 142(1): 2-8.
2. Pandit L, Ban M, Sawcer S, Singhal B, Nair S, Radhakrishnan K, et al. Evaluation of the established non-MHC multiple sclerosis loci in an Indian population. Mult Scler 2011; 17(2): 139-43.
3. Etemadifar M, Maghzi AH. Sharp increase in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Isfahan, Iran. Mult Scler 2011; 17(8): 1022-7.
4. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. Lancet Neurol 2010; 9(7): 727-39.
5. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. Lancet Neurol 2004; 3(2): 104-10.
6. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. Cytokine Growth Factor Rev 2008; 19(5-6): 333-45.
7. Poggi A, Zocchi MR. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. Front Immunol 2014; 5: 27.
8. Glas J, Seiderer J, Bayrle C, Wetzke M, Fries C, Tillack C, et al. The role of osteopontin (OPN/SPP1) haplotypes in the susceptibility to Crohn's disease. PLoS One 2011; 6(12): e29309.
9. Shimizu Y, Ota K, Ikeguchi R, Kubo S, Kabasawa C, Uchiyama S. Plasma osteopontin levels are associated with disease activity in the patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. J Neuroimmunol 2013; 263(1-2): 148-51.
10. Kaleta B. Role of osteopontin in systemic lupus erythematosus. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2014; 62(6): 475-82.
11. Zhang F, Luo W, Li Y, Gao S, Lei G. Role of osteopontin in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 2015; 35(4): 589-95.
12. Murugaiyan G, Mittal A, Weiner HL. Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. J Immunol 2008; 181(11): 7480-8.
13. O'Regan AW, Hayden JM, Berman JS. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. J Leukoc Biol 2000; 68(4): 495-502.
14. Bornsen L, Khademi M, Olsson T, Sorensen PS, Sellebjerg F. Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis. Mult Scler 2011; 17(1): 32-42.
15. Salvi V, Scutera S, Rossi S, Zucca M, Alessandria M, Greco D, et al. Dual regulation of osteopontin production by TLR stimulation in dendritic cells. J Leukoc Biol 2013; 94(1): 147-58.
16. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. Nat Immunol 2007; 8(1): 74-83.
17. Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. Nat Rev Immunol 2009; 9(6): 440-7.
18. Chiocchetti A, Orilieri E, Cappellano G, Barizzone N, D' Alfonso S, D' Annunzio G, et al. The osteopontin gene +1239A/C single nucleotide polymorphism is associated with type 1 diabetes mellitus in the Italian population. Int J Immunopathol Pharmacol 2010; 23(1): 263-9.
19. Barizzone N, Marchini M, Cappiello F, Chiocchetti A, Orilieri E, Ferrante D, et al. Association of osteopontin regulatory polymorphisms with systemic sclerosis. Hum Immunol 2011; 72(10): 930-4.
20. D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, et al. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2005; 52(2): 539-47.
21. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, et al. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. Blood 2004; 103(4): 1376-82.
22. Giacopelli F, Marciano R, Pistorio A, Catarsi P, Canini S, Karsenty G, et al. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. Physiol Genomics 2004; 20(1): 87-96.
23. O'Doherty C, Roos IM, Antiguedad A, Aransay AM, Hillert J, Vandenbroeck K. ITGA4 polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2007; 189(1-2): 151-7.
24. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev 2003; 8(3): 223-46.
25. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. Nat Rev Immunol 2009; 9(6): 393-407.
26. Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T, Toyoda N, Satoh T, Suzuki T, et al. Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells. Int Immunol 2001; 13(3): 367-76.
27. Marciano R, D'Annunzio G, Minuto N, Pasquali L, Santamaria A, Di DM, et al. Association of alleles at polymorphic sites in the Osteopontin encoding gene in young type 1 diabetic patients. Clin Immunol 2009; 131(1): 84-91.
28. Kariuki SN, Moore JG, Kirou KA, Crow MK, Utset TO, Niewold TB. Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. Genes Immun 2009; 10(5): 487-94.
29. Hummelshoj T, Ryder LP, Madsen HO, Odum N, Svejgaard A. A functional polymorphism in the Eta-1 promoter is associated with allele specific binding to the transcription factor Sp1 and elevated gene expression. Mol Immunol 2006; 43(7): 980-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 28.01.2016
Vol. 34, No. 380, 4th Week, June 2016
Accepted: 29.04.2016

Evaluation of the Frequency of Osteopontin Gene Polymorphism (rs28357094 T>G) and Its Receptor Gene (ITGA4- rs1449263 A>G) in Patients with Multiple Sclerosis in Comparison to Healthy Controls in Isfahan, Iran, Population

Fahimeh Dadkhah[1], Fereshteh Alsahebfosoul[2], Nahid Eskandari[2], Mansour Salehi[3], Masoud Etemadifar[4], Mohammad Kazemi[5]

Original Article

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Various factors including genetic and environmental factors are involved in the prevalence of MS. The Osteopontin (OPN) and its receptor Integrins alpha-4/beta-1 (ITGA4) have important role in immune response, so their encoding gene could be considered as a candidate for susceptibility to MS diseases. In the present study, we evaluated the frequency of OPN (rs28357094T > G) and ITGA4 (rs1449263A>G) polymorphisms in patients with MS compared with healthy controls in Isfahan, Iran, population.

Methods: Blood samples were collected from 100 patients with multiple sclerosis and 100 healthy controls. After DNA extraction, OPN (rs28357094) and ITGA4(rs1449263) polymorphisms were detected with high resolution melt real time polymerase chain reaction (HRM Real Time PCR) technique. The results were analyzed with the SPSS software.

Findings: In this study, frequency of TT genotype (OPN-rs28357094) (P = 0.020, OR = 1.85) and AA genotype (ITGA4 - rs1449263) (P = 0.012, OR = 2.10) in patients with multiple sclerosis were higher than the control group significantly.

Conclusion: The results of this study show that rs28357094 T>G on OPN gene and ITGA4-rs1449263A > G polymorphisms were associated with susceptibility to multiple sclerosis in Isfahan population.

Keywords: Multiple sclerosis, Polymorphism, OPN gene, ITGA4 gene

Citation: Dadkhah F, Alsahebfosoul F, Eskandari N, Salehi M, Etemadifar M, Kazemi M. **Evaluation of the Frequency of Osteopontin Gene Polymorphism (rs28357094 T>G) and Its Receptor Gene (ITGA4- rs1449263 A>G) in Patients with Multiple Sclerosis in Comparison to Healthy Controls in Isfahan Population.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(380): 422-9.

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Professor, Department of Neurosciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- PhD Student, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Fereshteh Alsahebfosoul, Email: alsahebfosoul@med.mui.ac.ir