

بررسی ارتباط بین وضعیت ویتامین D و پلی مورفیسم BsmI ژن گیرنده ویتامین D با بیماری هاشیموتو در شهر ارومیه

امیرحسین فغفوری^۱، مرتضی باقری^۲، علیرضا مهدی زاده^۳، پروین آیرملوی^۴، مهسا تیمور آذر^۵، رسول زرین^{۶*}

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۰۷/۲۷

چکیده

پیش زمینه و هدف: هاشیموتو به عنوان یکی از بیماری های شایع خودایمن تیروئیدی علت شناسی چندگانه ای دارد. وضعیت ویتامین D و پلی مورفیسم BsmI ژن گیرنده ویتامین D در ایجاد هاشیموتو مؤثر می باشند. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی ارتباط بین وضعیت ویتامین D و پلی مورفیسم BsmI با هاشیموتو می باشد.

مواد و روش کار: پژوهش مورد-شاهدی حاضر شامل ۱۰۵ فرد بزرگسال مبتلا به هاشیموتو و ۱۰۵ فرد سالم همگون شده از نظر سن، جنس و محل زندگی با گروه بیمار، می باشد. پلی مورفیسم BsmI با روش PCR-RFLP و بعد از همسان سازی دو گروه از منظر دریافت غذایی ویتامین D و مواجهه با نور خورشید، سطح سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D با روش الکتروکمیومیسانس تعیین شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های آماری کای اسکوتر، نسبت شانس، آنالیز واریانس، من ویتنی یو تست و تی مستقل استفاده شده است.

یافته ها: نتایج نشان داد که کمبود ویتامین D (≥ 20 نانوگرم بر میلی لیتر) در مقایسه با کفایت ویتامین D با افزایش خطر ابتلا به بیماری هاشیموتو همراه است (نسبت شانس = ۲/۷۴، محدوده اطمینان با ۰/۹۵: ۱/۲-۶/۲۵ و سطح معنی داری = ۰/۰۲). ژنوتیپ GG در بیماران هاشیموتو فراوانی بالاتری دارد (سطح معنی داری = ۰/۰۱). پلی مورفیسم های BsmI بر وضعیت ویتامین D اثر معنی داری ندارند (سطح معنی داری < ۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری: پلی مورفیسم BsmI و وضعیت ویتامین D بر خطر ابتلا به هاشیموتو تأثیرگذار می باشد. لذا مطالعات بیشتری جهت تعیین ارتباط پلی مورفیسم های ژن VDR با هاشیموتو و وضعیت ویتامین D مورد نیاز است.

کلیدواژه ها: هاشیموتو، گیرنده ویتامین D، پلی مورفیسم ژن، جایگاه BsmI، وضعیت ویتامین D

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره نهم، ص ۵۸۱-۵۷۲، آذر ۱۳۹۶

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تغذیه ۰۹۱۴۸۸۴۳۵۹۲

Email: rasoul.zarrin@uqconnect.edu.au

مقدمه

اختلالات غده تیروئید از مشکلات اندوکرینی شایع و گسترده می باشند و بیماری های اتوایمیون تیروئید به عنوان بخشی از این اختلالات عملکرد تیروئید را با چالش جدی مواجه می کنند (۱، ۲). این بیماری ها از لحاظ بالینی به صورت دو سندرم نمایان می شوند که شامل: بیماری گریوز و تیروئیدیت هاشیموتو می باشند (۳).

تیروئیدیت هاشیموتو در اثر واکنش آنتی بادی های سرم با تیروگلوبین و تیروئید پراکسیداز ایجاد می شود که به سیتوتوکسیسیته و در نهایت تخریب پیش رونده بافت تیروئید و هایپوتیروئیدیسم (کم کاری غده تیروئید) ختم می شود (۴، ۵). بیماری هاشیموتو از شایع ترین اختلالات خود ایمن اندوکرینی می باشند (۶). میزان بروز هایپوتیروئیدیسم اتوایمیون در بین

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ استادیار ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

^۳ استادیار، فوق تخصص غدد، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

^۴ مربی اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

^۵ کارشناس ارشد تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

^۶ استادیار علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

کشورهای جهان از ۲/۲ تا ۴۹۸/۴ مورد به ازای هر ۱۰۰,۰۰۰ نفر در سال می‌باشد. شیوع این بیماری به‌طور کلی در میان زنان بیشتر از مردان بوده و برحسب منطقه جغرافیایی متفاوت می‌باشد و با توجه به اینکه، مطالعات در نقاط محدودی از جهان انجام گرفته است آمار یادشده برای دیگر نقاط جهان قابل تعمیم نیست (۷).

عوامل خطر زیادی در بروز این بیماری مؤثر است که در کل می‌توان این عوامل را به دو جزء محیطی و ژنتیکی طبقه‌بندی کرد. عوامل محیطی شامل: دوره باروری بلند، نوزاد با مادر مبتلا به هاشیموتو، وزن کم هنگام تولد، سندرم تخمدان پلی کیستیک، مصرف سیگار، استرس‌های روانی، رادیاسیون، مصرفید بیش‌ازحد، دریافت کم سلنیوم، مختل‌کننده‌های غدد درون‌ریز مثل آمیدها، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی مانند هپاتیت C و یرسینیا، مصرف داروهایی مثل اینترفرون آلفا، جراحی و تروما و دمای کم محیط می‌باشد (۸). آلل‌های مختلف برخی از ژن‌ها نیز می‌توانند بر میزان خطر ابتلا به بیماری هاشیموتو تأثیرگذار باشد که ژن‌های یادشده به دودسته ژن‌های تنظیم‌کننده ایمنی و ژن‌های مختص تیروئید تقسیم می‌شوند. ژن‌های گروه اول شامل CTLA-4، HLA-DR و PTPN22 و ژن گروه دوم ژن تیروگلوبین می‌باشد (۹).

مواد مغذی نیز می‌توانند بر عملکرد ایمنی و مقاومت در برابر اختلالات اتوایمیون اثر بگذارند که ازجمله این مواد مغذی می‌توان به ویتامین D اشاره کرد که رابطه آن با اختلالات اتوایمیون تیروئیدی در دست مطالعه است (۱۰، ۱۱). اگرچه برخی یافته‌ها از اثر ویتامین D در درمان و یا پیشگیری از بیماری‌های تیروئیدی پرده بر می‌دارند ولی این اثر هنوز بحث‌برانگیز است و هیچ نقشه راهی در این زمینه وجود ندارد، درنتیجه کارآزمایی‌های بالینی بیشتری جهت اثبات این ادعا موردنیاز است (۱۲). کوله کلسیفرول (D₃) یا از طریق تابش مستقیم نور خورشید به پوست در این ناحیه به وجود می‌آید و یا اینکه از راه منابع غذایی وارد بدن می‌شود و به ترتیب در اثر هیدروکسیلاسیون در کبد کلیه به ۲۵- هیدروکسی ویتامین کوله کلسیفرول و ۱ و ۲۵- دی هیدروکسی کوله کلسیفرول (فرم فعال ویتامین D) تبدیل می‌شود. فرم فعال این ویتامین، از طریق اتصال به گیرنده‌های هسته‌ای عملکردهای فیزیولوژیکی خود را که شامل کنترل هموستاز کلسیم و فسفر، مهار سیتوکین‌های التهابی مثل گاما-اینترفرون، مهار رشد و افزایش تمایز سلول‌های اپی‌تلیوم، تنظیم سیستم ایمنی و عملکردهای مختلف دیگر می‌باشد را انجام می‌دهد. ویتامین D از این طریق، در مسیرهای متابولیک مثل پاسخ ایمنی و احتمالاً پیشگیری از سرطان‌ها نقش دارد (۱۳). گیرنده ویتامین D عملکردهای فوق‌الذکر را با اثر بر بیان ژن به انجام می‌رساند (۱۴).

برخی تنوع‌های ژنتیکی در گیرنده ویتامین D شناسایی شده‌اند که بر عملکرد ویتامین D مؤثر است. این تنوع‌ها در توالی DNA که عمدتاً در جمعیت‌ها مشاهده می‌شود، به‌عنوان پلی‌مورفیسم گیرنده ویتامین D شناخته می‌شود. (۱۵). ژن گیرنده ویتامین D بر روی کروموزوم ۱۲ قرارگرفته و دارای چندین مارکر ژنتیکی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به Taq-I, Tru-9-I, Apa-I Bsm-I, Fok-I و EcoRV اشاره کرد (۱۶). اثر این پلی‌مورفیسم‌ها به دلیل اثری که بر عملکرد ویتامین D دارند در بسیاری از بیماری‌های خود ایمن مطالعه شده است: ازجمله بیماری مالتیپل اسکلروزیس، بیماری التهابی روده و دیابت نوع یک (۱۷-۱۹).

پلی‌مورفیسم گیرنده ویتامین D می‌تواند با اثر بر عملکرد ویتامین D و درنتیجه آن با مکانیسم فیدبکی بر سطح فرم فعال ویتامین D اثر بگذارد و علاوه بر آن می‌تواند سطح ۲۵- هیدروکسی D₃ را نیز تحت تأثیر قرار دهد که این رابطه در مورد برخی بیماری‌های خودایمن مثل ویتیلیگو مشاهده شده است ولی در مطالعه صورت گرفته در این زمینه در بیماران هاشیموتو رابطه‌ای بین پلی‌مورفیسم‌های گیرنده ویتامین D ازجمله BsmI با وضعیت ویتامین D مشاهده نشد (۲۰-۲۲).

نتایج مطالعات در زمینه رابطه وضعیت ویتامین D بدن با بیماری هاشیموتو متناقض بوده است به‌طوری‌که در برخی یافته‌ها مشخص شده است که افراد دچار بیماری هاشیموتو سطح ۲۵- هیدروکسی ویتامین D پایین‌تری داشته‌اند ولی در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که سطوح پایین ویتامین D با بیماری‌های اتوایمیون تیروئید رابطه‌ای ندارد (۲۳، ۲۴). علاوه بر این پلی‌مورفیسم جایگاه BsmI ویتامین D می‌تواند با تغییر در تولید اینترفرون گاما در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با این بیماری مرتبط باشد (۲۵).

نتایج مشاهده شده از مطالعات باهدف بررسی رابطه پلی‌مورفیسم BsmI ژن گیرنده ویتامین D با بیماری هاشیموتو بسیار کم و نتایج نیز متناقض بوده است. به‌گونه‌ای که در مطالعه‌ای در کرواسی، پلی‌مورفیسم‌های BsmI با میزان خطر ابتلا به بیماری هاشیموتو رابطه داشتند، درحالی‌که در پژوهش دیگری در ایتالیا پلی‌مورفیسم‌های BsmI بیماران مبتلا به هاشیموتو تفاوت معنی‌داری با افراد سالم نداشته است (۲۶، ۲۷).

با توجه به متناقض بودن نتایج تحقیقات ذکرشده در دنیا، انجام نگرفتن مطالعه‌ای در این زمینه در ایران و مخصوصاً استان آذربایجان غربی، مطالعه مورد-شاهدی حاضر به دنبال تعیین ارتباط بین وضعیت ویتامین D و پلی‌مورفیسم‌های جایگاه BsmI ژن گیرنده ویتامین D با بیماری‌های هاشیموتو در شهر ارومیه می‌باشد. اطلاعات کنونی در این زمینه در حال حاضر در دنیا محدود می‌باشد

کارگر باشند (۳۴-۲۷). همچنین افراد فاقد بیماری دیابت نوع ۱، بیماری آدیسون، سیروز صفراوی اولیه، هپاتیت اتوایمون، بیماری کرون، اماس و هایپرپاراتیروئیدیسم اولیه، استئوپروز، انواع سرطان و هیچ‌گونه بیماری خودایمن، به علت رابطه این بیماری‌ها با پلی‌مورفیسم‌های ژن گیرنده ویتامین D، بودند (۳۵).

در نهایت بعد از گرفتن رضایت‌نامه کتبی از افراد و توضیح اهداف مطالعه، به‌عنوان نمونه وارد مطالعه شدند. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تمام مراحل این مطالعه را تأیید کرده است.

روش جمع‌آوری داده:

اطلاعات دموگرافیک شامل سن، جنس، محل زندگی، وضعیت سیگار کشیدن، تاریخچه بیماری و دارویی و میزان مصرف مکمل ویتامین D افراد از پرسشنامه اطلاعات عمومی به دست آمد. اطلاعات مربوط به دریافت غذایی ویتامین D از پرسشنامه معتبر کوتاه مواد غذایی ۴۴ آیتم که مخصوص سنجش دریافت ویتامین D و سلنیوم می‌باشد گرفته شد. این پرسشنامه شامل شیر، لبنیات، انواع گوشت، ماکیان، تن و ماهی، قارچ، مرغ و جگر بود و میزان تکرار مصرف را در طی شش ماه گذشته بررسی می‌کرد.

Face Validity و روایی محتوایی پرسشنامه با نظر ۴ نفر از متخصصین تغذیه گروه علوم تغذیه دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تأیید شده است. برای تعیین پایایی پرسشنامه از ۲۰ درصد افراد ثبت غذایی سه روزه گرفته و ضریب همبستگی درونی محاسبه شد. برای ویتامین D این میزان همبستگی ۰/۸۳ به دست آمده است. (۰/۹۲-۰/۶۹، محدوده اطمینان با ۰/۹۵٪: ۰/۰۱ < سطح معنی‌داری). آنالیز دریافت غذایی ویتامین D از طریق نرم‌افزار N4، انجام گرفت. برای اطلاعات مربوط به مواجهه با نور خورشید از پرسشنامه مواجهه با نور خورشید استفاده شده است که مقدار استفاده از کرم ضدآفتاب، رنگ پوست، میزان پوشش در برابر نورآفتاب، میزان مواجهه با نور خورشید در ساعات ظهر و استفاده از روش‌های پیشگیری در برابر نور خورشید را به دست آورده است.

اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی:

از همه افراد شرکت‌کننده در این مطالعه ۱۰ سی‌سی نمونه خون کامل وریدی گرفته شد و سپس ۵ سی‌سی از این نمونه خون محیطی را در لوله‌های ژل دار حاوی ماده تسریع‌کننده انعقاد ریخته و به آزمایشگاه منتقل کردیم. برای جداسازی سرم، نمونه‌های خونی را با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده‌اند. سرم‌ها تا زمان اندازه‌گیری بیوشیمیایی در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سطح سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D به‌وسیله کیت الکتروکیمولومینسانس Roche (Diagnostics, Mannheim, Germany) و بر اساس پروتکل کیت اندازه‌گیری شدند.

و این مطالعه می‌تواند به بیشتر شدن شواهد در زمینه تأثیر تفاوت‌های ژنوتیپی ژن VDR در بین جمعیت‌های مختلف بر عملکرد ویتامین D و در نتیجه بروز هاشیموتو منجر شود. همچنین تغییرات در فرم ساختاری VDR به دلیل اثر پلی‌مورفیسم ژن VDR، می‌تواند نیاز به دریافت ویتامین D از راه غذا و مواجهه با نور خورشید را تحت تأثیر قرار دهد و درک این رابطه در بیماران مبتلا به هاشیموتو در شهر ارومیه می‌تواند به توصیه‌های مناسب در زمینه دریافت ویتامین D به این بیماران منجر شود.

مواد و روش کار

جمعیت مورد مطالعه:

مطالعه حاضر یک مطالعه مورد-شاهدی می‌باشد که نمونه‌های این پژوهش را بیماران مبتلا به هاشیموتو مراجعه‌کننده به کلینیک غدد بیمارستان امام خمینی ارومیه از ابتدای بهار سال ۹۵ تا پایان تابستان سال ۹۵ تشکیل دادند. ۱۰۵ فرد مبتلا به هاشیموتو (۸۹ زن، ۱۹ مرد) با محدوده سنی ۱۸ تا ۶۵ سال (میانگین سنی: ۱۱/۸ ± ۳۸/۷) که بیماری آن‌ها طبق علائم بالینی و بیوشیمیایی توسط پزشک فوق تخصص غدد تشخیص داده شده بود وارد مطالعه شدند. این علائم شامل گواتر منتشر، آنتی تیروئید پراکسیداز مثبت، کاهش برداشتید رادیواکتیو، سطح FT4 پایین و هورمون محرک تیروئید بالاتر از نرمال بودند (۵).

در مقابل، ۱۰۵ فرد (۲۱ مرد، ۸۴ زن) با محدوده سنی ۱۸ تا ۶۵ سال (میانگین سنی: ۱۰/۵۷ ± ۳۹/۷۶) که هیچ‌گونه سابقه فامیلی، بالینی و بیوشیمیایی ابتلا به بیماری‌های خودایمن و اندوکرینی را نداشتند به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. گروه کنترل از نظر سن، جنس، محل زندگی، میزان مواجهه با نور خورشید و میزان دریافت ویتامین D از غذا و مکمل‌ها با گروه مورد به‌صورت گروهی همسان شدند.

معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: مصرف الکل، مصرف رادیواکتیو و یا هر نوع رادیاسیون، مصرف داروهای ضد تشنج (از جمله فنی توئین، فنوباریتال، پریمیدون، کاربامازپین، اکس کاربازپین، اسید والپروئیک، کلونازپام)، مصرف داروهای آنتی هایپرلیپیدمیک ضد اسهال شامل کلیسترآمین، مصرف کورتیکواستروئیدی خوراکی یا تزریقی (از جمله پردنیزون، پردنیزولون، دگزامتازون، تریا مسینولون، هیدروکورتیزون یا بتا متازون)، مصرف به یس فسفات‌ها شامل آلدرونت، آیبندرنات و ریزدرونت، ابتلا به هرگونه اختلال شدید گوارشی، کبدی، از جمله سلیاک، کرون، کولیت اولستراتیو، استاتوره، مشکلات صفراوی، اعمال عمل جراحی در دستگاه گوارش یا کبدی صفراوی و ابتلا به مشکلات حاد و مزمن کلیوی چون که توانند بر سطح 25(OH)D

روش بررسی ژنوتیپ:

۵ سی‌سی از نمونه خون وریدی در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد اتیلن دی آمین تتراسدیک اسید ریخته شده و تا زمان بررسی ژنوتیپ در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج DNA از خون کامل طبق پروتکل کیت استخراج (سیناژن، ایران) استفاده عمل شد.

تکثیر جایگاه BsmI با روش واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمریزاسیون و همراه با پرایمر مخصوص و توسط دستگاه ترموسایکلر صورت گرفت. مسترمیکس 2X (سیناژن، ایران) برای واکنش‌ها حاوی ۳ میلی‌مول بر میلی‌لیتر منیزیم کلرید، ۰/۴ میلی‌مول بر میلی‌لیتر از هرکدام از نوکلئوتیدهای تری فسفات و ۰/۰۸ واحد بر میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمرز بود. برای هر ۲۵ میکرولیتر محلول واکنش، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X، ۰/۵ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها، ۱ میکرولیتر DNA استخراج‌شده و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استفاده شد. توالی پرایمرها عبارت‌اند از:

5'-GGCAACCTGAAGGGAGACGTA-3' (F)

5'-CTCTTTGGACCTCATCACCGAC-3' (R)

تحت برنامه دستگاه ترموسایکلر، شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس در ۳۵ چرخه ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه تکثیر شد. درنهایت هم ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد. محصول PCR برای BsmI در منطقه ۴۶۱ جفت باز باند تشکیل می‌دهد. بعد از تیمار با آنزیم BsmI باند ۴۶۱ جفت بازی نشان‌دهنده آلل A و باندهای ۲۰۳ و ۲۵۸ جفت بازی نشان‌دهنده آلل G می‌باشند (شکل ۱).

تحلیل‌های آماری:

در این مطالعه، تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار (SPSS, Chicago, IL) نسخه ۲۴ صورت گرفته است. برای

مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های BsmI در دو گروه مورد و شاهد از آزمون کای اسکوتر (در صورت لزوم از آزمون دقیق فیشر) استفاده شده است. از نسبت شانس با محدوده اطمینان ۹۵ درصد برای بررسی رابطه بین انواع توزیع فراوانی ژنوتیپی با میزان خطر ابتلا به بیماری هاشیموتو استفاده شده است. برای مقایسه میانگین سطح سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D در دو گروه از آزمون تی مستقل استفاده شده است. همچنین برای بررسی رابطه بین توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های BsmI با سطح سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D از آنالیز واریانس استفاده شده است. در کلیه آزمون‌های آماری سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

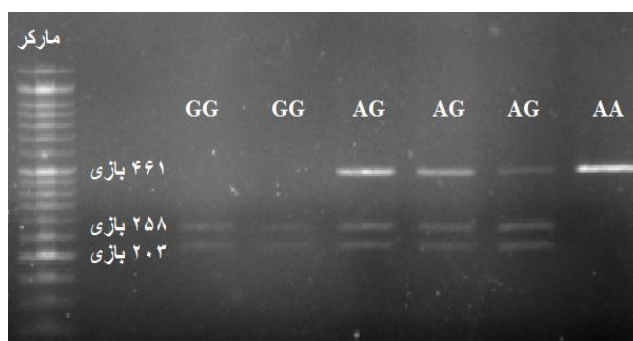
یافته‌ها

ویژگی نمونه‌های تحت مطالعه:

این مطالعه شامل ۱۰۵ فرد مبتلا به هاشیموتو در شهر ارومیه و ۱۱۷ فرد سالم از همان محل است. از نظر سن، جنس، میزان دریافت ویتامین D از مواد غذایی و مکمل‌ها میزان مواجهه با نور خورشید، رنگ پوست، نوع لباس در برابر نور خورشید و استفاده از کرم و سایر روش‌های پیشگیری، دو گروه همسان شدند (جدول ۱).

مقایسه میانگین سطح سرمی ویتامین D:

سطح سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D به‌عنوان وضعیت ویتامین D در بیماران مبتلا به هاشیموتو $16/09 \pm 34/44$ نانوگرم بر میلی‌لیتر) به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از افراد سالم ($15/38 \pm 39/81$ نانوگرم بر میلی‌لیتر) بوده است (سطح معنی‌داری = ۰/۰۱). همچنین بعد از همسان‌سازی از نظر سن و جنس، کمبود ویتامین D ($20 \leq$ نانوگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به کفایت ویتامین D ($30 >$ نانوگرم بر میلی‌لیتر) خطر ابتلا به هاشیموتو را به‌طور معنی‌داری بالا برده است (نسبت شانس = ۲/۷۴، محدوده اطمینان ۹۵ درصد: ۱/۲-۶/۲۵ و سطح معنی‌داری = ۰/۰۲).



شکل (۱): نمونه محصول PCR-RFLP برای جایگاه BsmI

جدول (۱): ویژگی پایه‌ای نمونه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه کنترل (تعداد = ۱۰۵)	بیماران (تعداد = ۱۰۵)	سطح معنی داری
سن (سال)	۱۰/۵۷ ± ۳۹/۷۶	۱۱/۸ ± ۳۸/۷	* ۰/۱۹
دریافت ویتامین د از غذا (میکروگرم در روز)	۸۱/۹۵ ± ۱۳۵/۱۳	۷۸/۳۷ ± ۱۲۱/۱۳	۰/۱۶*
دریافت ویتامین د از مکمل (میکروگرم در روز)	۱۳۵۵/۷۷ ± ۱۸۵۱/۲۳	۱۵۷۵/۱۸ ± ۱۷۹۶/۱۵	* ۰/۷
زنان / مردان	۲۱/۸۴	۱۶/۸۹	† ۰/۳۶
رنگ پوست	۴۳	۴۲	† ۰/۸۹
تیره	۶۲	۶۳	
روشن			
مواجهه مستقیم با نور خورشید	۶۲	۶۳	† ۰/۹
کمتر از ۳۰ دقیقه	۲۲	۲۳	
بین ۳۰ تا ۶۰ دقیقه	۱۰	۷	
بین ۶۰ تا ۱۲۰ دقیقه	۱۱	۱۲	
بیشتر از ۱۲۰ دقیقه			
پوشش در برابر نور آفتاب	۷۱	۷۷	† ۰/۵۵
کامل	۳۰	۲۶	
قسمت‌هایی	۴	۲	
آزاد			
مصرف کرم ضد آفتاب	۵۷	۵۴	† ۰/۶۸
بدون استفاده	۴۲	۴۷	
استفاده با فاکتور محافظت خورشید بالاتر از ۱۵	۶	۴	
استفاده بدون اطلاع از فاکتور محافظتی خورشید			

* من ویتنی یو تست

† کای اسکوتر

مقایسه پلی مورفیسم BsmI گیرنده ویتامین D:

توزیع ژنوتیپ های BsmI در بین افراد گروه کنترل دارای توزیع نرمال در تعادل هاردی- واینبرگ می باشد (سطح معنی داری = ۰/۱۹). با بررسی ژنوتیپ های جایگاه BsmI مشخص شد که ژنوتیپ AA در افراد سالم غیر تیروئیدی نسبت به افراد بیمار فراوانی بالاتری داشت (نسبت معنی داری = ۰/۰۱). با همسان سازی سن و جنس، ژنوتیپ های AG و GG خطر ابتلا به هاشیموتو را در مقایسه با ژنوتیپ AA افزایش داد (به ترتیب، نسبت شانس = ۲/۵۳ در محدوده اطمینان ۹۵ درصد ۵/۲۹-۱/۱۲؛ سطح معنی داری = ۰/۰۱ و نسبت شانس = ۳/۱۷ در محدوده اطمینان ۹۵ درصد ۷/۹۳-۱/۲۷؛ سطح معنی داری = ۰/۰۱). همچنین آلل G به طور معنی داری شانس ابتلا به بیماری هاشیموتو را افزایش داده است (نسبت شانس =

۱/۵۸، محدوده اطمینان با ۰/۹۵: ۲/۳۳-۱/۰۸ سطح معنی داری = ۰/۰۲). با همسان سازی دو گروه از نظر سن و جنس نیز آلل G باعث افزایش خطر معنی دار ابتلا به هاشیموتو می شود، (نسبت شانس = ۱/۵۲، محدوده اطمینان با ۰/۹۵: ۲/۲۵-۱/۰۳ سطح معنی داری = ۰/۰۳). توزیع فراوانی ژنوتیپ های BsmI در جدول ۲ مشخص شده است.

مقایسه میانگین ویتامین D در ژنوتیپ های BsmI:

با بررسی میانگین سطح ویتامین D در ژنوتیپ های مختلف BsmI مشخص شد که در هر دو گروه افراد با ژنوتیپ AA میانگین وضعیت ویتامین D بهتری از افراد با ژنوتیپ های AG و GG دارند. ولی هیچ یک از تفاوت ها معنی دار نمی باشد (سطح معنی داری < ۰/۰۵).

جدول (۲) توزیع فراوانی ژنوتیپ های BsmI در گروه بیمار و سالم

سطح معنی داری	نسبت شانس با محدوده اطمینان ۹۵٪	کنترل (تعداد = ۱۰۵)	هاشیموتو (تعداد = ۱۰۵)	
				ژنوتیپ های BsmI
۰/۰۱	۱ (فرنس)	۳۱ (۲۹/۵)	۱۴ (۱۳/۳)	AA
۰/۰۱	۲/۵۷ (۱/۲۶-۵/۳۴)	۵۸ (۵۵/۲)	۶۸ (۶۴/۸)	AG
	۳/۱۸ (۱/۳-۷/۸)	۱۶ (۱۵/۳)	۲۳ (۲۱/۹)	GG
				آل های BsmI
۰/۰۲	۱ (فرنانس)	۱۲۰ (۵۷/۱)	۹۶ (۴۵/۷)	A
	۱/۵۸ (۱/۰۸-۲/۳۳)	۹۰ (۴۲/۹)	۱۱۴ (۵۴/۳)	G

بحث و نتیجه گیری

بیماری های خودایمن تیروئیدی از جمله بیماری هاشیموتو اتیولوژی پیچیده ای دارند و یک سری از عوامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد این بیماری ها مؤثر می باشند (۲). ناکفایتی یا کمبود ویتامین d با ایجاد و پیشرفت این بیماری مرتبط می باشند به طوری که مکمل یاری با ویتامین D می تواند بر درمان این بیماری ها از طریق کاهش سطح آنتی بادی ضد تیروئید پراکسیداز مؤثر باشد (۲۳، ۳۶). علاوه بر این، فرم فعال ویتامین D از طریق اتصال به گیرنده ویتامین D می تواند باعث مهار تولید سیتوکین های التهابی از طریق تولید اینترلوکین-۶ توسط مونوسیت ها، ماکروفاژها و لنفوسیت های T شود (۱۳).

در مطالعه مورد-شاهدی حاضر، ما وضعیت ویتامین D را در بین ۱۰۵ فرد مبتلا به هاشیموتو و ۱۰۵ فرد سالم برای اولین بار در شمال غرب ایران مقایسه کردیم و به این نتیجه رسیدیم که افراد مبتلا به تیروئیدیت هاشیموتو وضعیت ویتامین D نامطلوب تری نسبت به افراد سالم غیر تیروئیدی در شهر ارومیه دارند و کمبود ویتامین D در این جمعیت باعث افزایش خطر ابتلا به هاشیموتو می شود. این نتایج با یافته های مطالعات قبلی در این زمینه مطابقت دارد. برای نمونه Kivity و همکاران نشان دادند که سطوح پایین سرمی ویتامین D با پاتوژنز بیماری های خودایمن تیروئیدی رابطه دارد (۳۷). همچنین سایر مطالعات در هند و کره جنوبی نشان دادند که افراد مبتلا به هاشیموتو به عنوان بیماری های خودایمن تیروئیدی دارای سطح سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D پایین تری نسبت به افراد سالم می باشند (۳۸، ۳۹).

ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن گیرنده ویتامین D با بیماری های خودایمن تیروئیدی برای اولین بار در یک مطالعه ای در ژاپن بررسی شد و مشخص شد که ژنوتیپ های FokI با خطر ابتلا به بیماری گریوز ارتباط دارد (۴۰). بعد از آن چند مطالعه در نقاط گوناگون جهان در این زمینه انجام گرفته است و برخی مطالعات نیز باهدف تعیین عملکرد پلی مورفیسم های مختلف ژن گیرنده ویتامین

D انجام گرفته است. در مورد BsmI مشخص شده است که افراد حامل آلل A سطح تولید اینترفرون گامای بیشتری در سلول های تک هسته ای خون محیطی دارند (۴۱).

در این مطالعه ما برای نخستین بار فراوانی ژنوتیپ های جایگاه BsmI را در ایران مورد بررسی قرار دادیم و به این نتیجه رسیدیم که ژنوتیپ AA در بین افراد سالم فراوانی بیشتری دارد و باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری هاشیموتو می شود. همچنین مشخص شد آلل G به عنوان ریسک فاکتور ابتلا به تیروئیدیت هاشیموتو می باشد. مطالعات قبلی نتایج متناقضی دارند، به طوری که آلل A در مطالعه ای در چین فراوانی بیشتری در بیماران مبتلا به بیماری های خودایمن تیروئیدی داشته است در حالی که در مطالعه دیگری که در ترکیه انجام گرفته است ژنوتیپ های BsmI با بیماری هاشیموتو هیچ گونه رابطه ای نداشته است (۴۲، ۴۳). فرضیه محتمل برای توجیه این نتایج نامتناقض، تفاوت های جغرافیایی و نژادی جمعیت تحت مطالعه می باشد.

پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D همچنین ممکن است وضعیت ویتامین D را از طریق مکانیسم فیدبکی و با اثر بر هموستاز کلسیم تغییر دهد (۲۰). جایگاه BsmI در اینترون ۸ می باشد و در نتیجه اثری در ساختار پروتئین گیرنده ویتامین D ندارد، با این وجود این پلی مورفیسم می تواند در ارتباط با سایر پلی مورفیسم های این ژن از جمله 3'-UTR باشد و از این طریق می تواند بر پایداری mRNA و در نتیجه بیان ژن و سطوح متابولیت های ویتامین D اثرگذار باشد (۴۴).

ما برای اولین بار رابطه بین پلی مورفیسم ژن گیرنده ویتامین D را با وضعیت ویتامین D را با در نظر گرفتن وضعیت و مقدار مواجهه با نور خورشید و همچنین میزان دریافت ویتامین D از مواد غذایی و مکمل های غذایی در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار دادیم. نتایج ما نشان داده است ژنوتیپ و آلل های BsmI با وضعیت ویتامین D ارتباط معنی داری ندارد. مطالعات کمی در این زمینه در دنیا انجام گرفته است. در مطالعه ای در ایتالیا هیچ رابطه ای بین وضعیت

فاکتورهای بیوشیمیایی مرتبط با بیماری هاشیموتو و در نظر نگرفتن مدت زمان ابتلا به بیماری به دلیل نبود اطلاعات کافی بیمارستانی می باشد. در نتیجه مطالعات بیشتری در این زمینه در جمعیت های مختلف ایران و با وارد کردن تعداد نمونه بیشتر مورد نیاز می باشد.

تشکر و قدردانی

کلیه هزینه های این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تقبل گردید. نویسندگان این مقاله از تمام افرادی که در اجرای پژوهش همکاری داشتند و به خصوص خانواده های محترم شرکت کننده در این مطالعه تشکر و قدردانی می نمایند.

ویتامین D با پلی مورفیسم BsmI مشاهده نشد (۲۲). در نتیجه مطالعات بیشتری باهدف بررسی پلی مورفیسم های ژن گیرنده ویتامین D با بیماری های خودایمن تیروئیدی مورد نیاز است تا نتایج قطعی در این زمینه گرفته شود.

نتیجه نهایی مطالعه ما این می باشد که افراد مبتلا به بیماری هاشیموتو وضعیت ویتامین D نامناسبی نسبت به افراد سالم دارند و آلل A از ژنوتیپ BsmI در جمعیت ارومیه به عنوان عامل محافظ در برابر این بیماری مطرح شده است. همچنین پلی مورفیسم های BsmI ژن گیرنده ویتامین D نمی تواند وضعیت ویتامین D را در این جمعیت تحت تأثیر قرار دهد. نکته ضعف مطالعه حاضر عدم بررسی تمام پلی مورفیسم های ژن گیرنده ویتامین D، وارد نکردن بیماران گریوز به مطالعه به دلیل نبود نمونه کافی و بررسی نکردن

References:

1. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 2011;99:39-51.
2. Eschler DC, Hasham A, Tomer Y. Cutting edge: the etiology of autoimmune thyroid diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2011;41(2):190-7.
3. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev* 2015;14(2):174-80.
4. Paknys G, Kondrotas AJ, Kevelaitis E. Risk factors and pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 2009;45(7):574-83.
5. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev* 2014;13:391.
6. Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocrine Rev* 2008;29(6):725-697.
7. McGrogan A, Seaman HE, Wright JW, de Vries CS. The incidence of autoimmune thyroid disease: a systematic review of the literature. *Clin Endocrinol* 2008;69(5):687-96.
8. Guarneri F, Benvenga S. Environmental factors and genetic background that interact to cause autoimmune thyroid disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007;14(5):398-409.
9. Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J Autoimmun* 2009;32(3-4):231-9.
10. Harbige LS. Nutrition and immunity with emphasis on infection and autoimmune disease. *Nutr Health* 1996;10(4):285-312.
11. Wang J, Lv S, Chen G, Gao C, He J, Zhong H, et al. Meta-Analysis of the Association between Vitamin D and Autoimmune Thyroid Disease. *Nutrients* 2015;7(4):2485-98.
12. Muscogiuri G, Tirabassi G, Bizzaro G, Orio F, Paschou SA, Vryonidou A, et al. Vitamin D and thyroid disease: to D or not to D? *Eur J Clin Nutr* 2015;69(3):291-6.
13. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998;13(3):325-49.
14. Saccone D, Asani F, Bornman L. Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. *Gene* 2015;561(2):171-80.

15. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006;371(1-2):1-12.
16. 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.
17. Huang J, Xie ZF. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and multiple sclerosis risk: a meta-analysis of case-control studies. *J Neurol Sci* 2012;313(1-2):79-85.
18. Kamel MM, Fouad SA, Salaheldin O, El-Razek Ael R, El-Fatah AI. Impact of vitamin D receptor gene polymorphisms in pathogenesis of Type-1 diabetes mellitus. *Int J Clin Experimen Med* 2014;7(12):5505-10.
19. Wang L, Wang ZT, Hu JJ, Fan R, Zhou J, Zhong J. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene and the risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Genetics and molecular research: GMR* 2014;13(2):2598-610.
20. Bhanushali AA, Lajpal N, Kulkarni SS, Chavan SS, Bagadi SS, Das BR. Frequency of fokI and taqI polymorphism of vitamin D receptor gene in Indian population and its association with 25-hydroxyvitamin D levels. *Indian J Human Genetics* 2009;15(3):108-13.
21. Li K, Shi Q, Yang L, Li X, Liu L, Wang L, et al. The association of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D levels with generalized vitiligo. *Br J Dermatol* 2012;167(4):815-21.
22. Giovinazzo S, Vicchio TM, Certo R, Alibrandi A, Palmieri O, Campenni A, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms/haplotypes and serum 25 (OH) D3 levels in Hashimoto's thyroiditis. *Endocrine* 2017;55(2):599-606.
23. Ma J, Wu D, Li C, Fan C, Chao N, Liu J, et al. Lower Serum 25-Hydroxyvitamin D Level is Associated With 3 Types of Autoimmune Thyroid Diseases. *Medicine* 2015;94(39):e1639.
24. Effraimidis G, Badenhoop K, Tijssen JG, Wiersinga WM. Vitamin D deficiency is not associated with early stages of thyroid autoimmunity. *Eur J Endocrinol* 2012;167(1):43-8.
25. Inoue N, Watanabe M, Ishido N, Katsumata Y, Kagawa T, Hidaka Y, et al. The functional polymorphisms of VDR, GC and CYP2R1 are involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2014;178(2):262-9.
26. Štefanić M, Papić S, Suver M, Glavaš-Obrovac L, Karner I. Association of vitamin D receptor gene 3'-variants with Hashimoto's thyroiditis in the Croatian population. *Int J Immunogenetics* 2008;35(2):125-31.
27. Corrao G, Bagnardi V, Zamboni A, Torchio P. Meta-analysis of alcohol intake in relation to risk of liver cirrhosis. *Alcohol Alcohol* 1998;33(4):381-92.
28. Wei S, Baloch ZW, LiVolsi VA. Parathyroid adenoma in patients with Graves' disease: a report of 21 cases. *Endocr Pathol* 2015;26(1):71-4.
29. Weinstein RS, Bryce GF, Sappington LJ, King DW, Gallagher BB. Decreased serum ionized calcium and normal vitamin D metabolite levels with anticonvulsant drug treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58(6):1003-9.
30. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's food, nutrition, & diet therapy. 14th ed. Saunders Philadelphia; 2012. P. 145.
31. Kennel KA, Drake MT. Adverse Effects of Bisphosphonates: Implications for Osteoporosis Management. *Mayo Clinic Proceedings*. 2009;84(7):632-8.
32. Lo C, Paris P, Clemens T, Nolan J, Holick M. Vitamin D absorption in healthy subjects and in

- patients with intestinal malabsorption syndromes. *Am J Clin Nutr* 1985;42(4):644-9.
33. Williams S, Malatesta K, Norris K. Vitamin D and Chronic Kidney Disease. *Ethn Dis* 2009;19(4 Suppl 5):S5-8-11.
 34. de Bragança AC, Volpini RA, Canale D, Gonçalves JG, Shimizu MHM, Sanches TR, et al. Vitamin D deficiency aggravates ischemic acute kidney injury in rats. *Physiol Rep* 2015;3(3).
 35. Wang L, Wang ZT, Hu JJ, Fan R, Zhou J, Zhong J. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene and the risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2014;13(2):2598-610.
 36. Chaudhary S, Dutta D, Kumar M, Saha S, Mondal SA, Kumar A, et al. Vitamin D supplementation reduces thyroid peroxidase antibody levels in patients with autoimmune thyroid disease: An open-labeled randomized controlled trial. *Indian J Endocrinol Metab* 2016;20(3):391-8.
 37. Kivity S, Agmon-Levin N, Zisappl M, Shapira Y, Nagy EV, Danko K, et al. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases. *Cell Mol Immunol* 2011;8(3):243-7.
 38. Choi YM, Kim WG, Kim TY, Bae SJ, Kim HK, Jang EK, et al. Low levels of serum vitamin D3 are associated with autoimmune thyroid disease in premenopausal women. *Thyroid* 2014;24(4):655-61.
 39. Goswami R, Marwaha RK, Gupta N, Tandon N, Sreenivas V, Tomar N, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and its relationship with thyroid autoimmunity in Asian Indians: a community-based survey. *Br J Nutr* 2009;102(3):382-6.
 40. Ban Y, Ban Y, Taniyama M, Katagiri T. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism in Japanese patients with Graves' disease. *Thyroid* 2000;10(5):375-80.
 41. Shimada A, Kanazawa Y, Motohashi Y, Yamada S, Maruyama T, Ikegami H, et al. Evidence for association between vitamin D receptor BsmI polymorphism and type 1 diabetes in Japanese. *J Autoimmun* 2008;30(4):207-11.
 42. Huo X, Wei F, Huo J, Su R, Xue Y, Wei J. Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphism with autoimmune thyroid disease in Innermongolia People of the Han Nationality. *J Radioimmunol* 2010;23:72-4.
 43. Yazici D, Yavuz D, Tarcin O, Sancak S, Deyneli O, Akalin S. Vitamin D receptor gene ApaI, TaqI, FokI and BsmI polymorphisms in a group of Turkish patients with Hashimoto's thyroiditis. *Minerva Endocrinologica* 2013;38(2):195-201.
 44. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R, et al. The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2009;8(7):621-6.

ASSOCIATION OF VITAMIN D STATUS AND BSMI POLYMORPHISM IN VITAMIN D RECEPTOR GENE WITH HASHIMOTO DISEASE IN URMIA

Amir Hoseein Faghfouri¹, Morteza Bagheri², Alireza Mehdizadeh³, Parvin Ayremlou⁴ Mahsa Teymour Azar¹, Rasoul Zarrin^{5*}

Received: 16 Aug, 2017; Accepted: 19 Oct, 2017

Abstract

Background & Aims: The hashimoto thyroiditis as a common autoimmune thyroid disease have a multifactorial etiology. Vitamin D status and vitamin D receptor gene BsmI polymorphism are involved in hashimoto developing. The aim of this research was to study the association between 25hydroxy vitamin D serum levels and BsmI polymorphism with hashimoto.

Materials & Methods: We conducted a case-control study of 105 adults with hashimoto thyroiditis and 105 matched healthy controls. BsmI polymorphism was investigated by PCR-RFLP. Moreover, after matching two groups for vitamin D intakes from diet and sun exposure habits, serum levels of 25-hydroxyvitamin D as vitamin D status were measured by electrochemiluminescence immunoassay. Data were analyzed with chi-square test, odds ratio, ANOVA, Mann-Whitney U test and independent t-test.

Results: Vitamin D deficiency ($\leq 20\text{ng/ml}$) was associated with higher susceptibility to hashimoto compared with vitamin D sufficiency ($\geq 30\text{ng/ml}$) ($P = 0.02$; adjusted OR = 2.74 CI 95%, 1.2-6.25). BsmI-"GG" genotype was higher in hashimoto group ($P = 0.01$). BsmI polymorphisms were not effective in vitamin D status ($P > 0.05$).

Conclusion: Our results revealed that vitamin D status and BsmI polymorphisms are involved in susceptibility to hashimoto disease. Further investigations of the relationship between VDR gene polymorphisms with hashimoto and vitamin D status are needed.

Keywords: Vitamin D receptor, Gene polymorphism, BsmI, Vitamin D, Hashimoto

Address: Department of Nutrition, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Nazloo Road, Urmia, Iran

Tel: +989148843592

Email: rasoul.zarrin@uqconnect.edu.au

SOURCE: URMIA MED J 2017; 28(9): 581 ISSN: 1027-3727

¹ MSc in Clinical Nutrition, Department of Nutrition, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

² Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

³ Assistant Professor, Department of Endocrinology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁴ Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran

⁵ Assistant Professor of Nutrition, Department of Nutrition, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)