مطالعه پلی مرفیسم کدون ۲۵ ژن TGFβ در بیماران مبتلا به دیابت تیپ I

دکتر مهتاب مسعود*- دکتر عیسی صالحی**- دکتر نوشین شیخ بهایی **- دکتر اسدالله رجب***- دکتر محمد وجگانی****- دکتر احمد مسعود****

*پزشک عمومی

** دانشجوی دوره Ph.D ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** متخصص غدد، انجمن دیابت ایران

**** استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۸۶/۳/۲۹

چکیده

مقدمه: دیابت تیپ I یکی از بیماری‌های خودایمن است که با تخریب سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس همراه است و بیشتر افراد را، در نوجوانی و جوانی مبتلا می‌کند. زمینه‌های ژنتیکی، محیطی و نیز ایمونولوژی در ایجاد و پیدایش عوارض مختلف این بیماری نقش دارند. TGFβ یکی از سیتوکین‌هایی است که در تنظیم و مهار پاسخ‌های ایمنی نقش دارد و ترشح غیرطبیعی آن در بیماری‌های خودایمنی دیده می‌شود. پلی مرفیسم ناحیه ۹۱۵+ ژن TGFβ، تولید و ترشح این سیتوکین را تحت تاثیر قرار می‌دهد و به‌عنوان عامل خطر در بیماری‌های خودایمن قلمداد می شود.

هدف: مقایسه پلی مورفیسم کدون ۲۵ ژن TGFβ در بیماران با گروه شاهد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع مورد – شاهدی بود و ۷۵ بیمار دچار دیابت تیپ I که تشخیص آنها حداقل ۲ سال پیش از نمونه‌گیری توسط پزشک متخصص قطعی شده و با انسولین درمان می‌شدند و گروه کنترل از داوطلبان اهدای خون که به سازمان انتقال خون ایران مراجعه کرده بودند پس از اخذ رضایت انتخاب شدند.

از نرم افزار SPSS برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و از آزمون آماری مربع کای با حدود اطمینان۹۵٪ برای مقایسه نتایج استفاده شد .

نتایج: تفاوت آماری معنی‌داری در پلی‌مرفیسمC/G در ناحیه ۹۱۵+ بین بیماران و گروه شاهد وجود نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: اگر چه پلی‌مرفیسم ناحیه ۹۱۵+ ژن TGF-β تولید این سیتوکین را تحت تاثیر قرار می‌دهد و این سیتوکین در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش‌اساسی دارد، اما وجود نوکلیوتیدهایC یا G در جایگاه ۹۱۵+ کدون ۲۵ نمی‌تواند به‌عنوان فاکتور خطر یا مستعدکننده در بروز بیماری دیابت درنظرگرفته‌شود.

کلید واژه ها: دیابت شیرین وابسته به انسولین/ فاکتور رشد متغیر بتا/ نوکلوتیدها

مقدمه

دیابت تیپ I یکی از بیماری‌های خود ایمن رو به افزایش است که با تخریب سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده و از دست دادن مادام‌العمر توانایی تولید انسولین مشخص می‌شود(۱و۲).

زمینه ژنتیک و عوامل محیطی در بروز این بیماری نقش مهمی دارند و بیماری غالبا در سن پایین بروز می‌کند. وابستگی مطلق بیمـــاران به درمان‌های طولانی مدت و عوارض ناشی از بیماری، هزینه‌های انسانی و اقتصادی زیادی را به جامعه تحمیل می‌کند(۳).

در بررسی‌های مختلف، اختلال سیتوکین‌ها و به هم‌خوردگی تعادل شبکه‌ی سیتوکینی در پاتوژنز مؤثر شناخته شده‌است. غالب محققان بر این عقیده‌اند که تبدیل لنفوسیت‌های Th1 به Th2 که الگوی ترشح سیتوکینی خاصی‌دارد، موجب فعال‌شدن لنفوسیت‌های اتوراکتیو شده و باعث تهاجم آنها به پانکراس و در نهایت تخریب سلول‌های بتای آن می‌شود(۷-۴).

نویسنده مسئول: دکتر مهتاب مسعود؛ تهران- خیابان انقلاب- خیابان پورسینا- دانشکده‌پزشکی‌دانشگاه‌علوم‌پزشکی‌تهران- گروه ایمونولوژی ۱

massoud ah_2002@yahoo.com

جابجایی نوکلئوتیدها در نواحی تنظیم‌کننده ژن‌های سیتوکین(پلی‌مرفیسم) تأثیر زیادی بر میزان ترشح سیتوکین‌ها دارد و از طرفی حضور آلل‌های متفاوت ژن‌های سیتوکین‌های مختلف بر تعادل نهایی شبکه سیتوکینی مؤثر است(۶و۷).

TGFβ سیتوکینی است که بر تکثیر و تمایز سلول‌ها و تولید ماتریکس اثر دارد و با تأثیر بر ترشح سیتوکین‌های دیگر موجب تنظیم و عمدتاً مهار پاسخ‌های ایمنی می‌شود. ژن TGFβ در انسان بر روی کروموزوم ۱۹ و در جایگاه q13 قرار گرفته و از ۷ اگزون تشکیل شده که پروتئین پیش‌ساز ۳۹۰ آمینواسید را می‌سازد. حدود ۸ پلی‌مرف از TGFβ شناسایی شده که پلی‌مرفیسم G/C در جایگاه ۹۱۵+ یکی از آنهاست. پلی‌مرفیسم ژن TGFβ با تأثیر بر اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری، تولید، ترشح و فعالیت آن را متأثر می‌کند یعنی در ناحیه ۹۱۵+ کدون ۲۵، عمدتا بر میزان تولید این سیتوکین تاثیر می‌گذارد. تاثیر TGFβ بر تنظیم شبکه سیتوکینی و پاسخ‌های ایمنی در بررسی‌های قبلی ثابت شده‌است.

در این مطالعه، پلی‌مرفیسم ناحیه ۹۱۵+ ژن TGFβ در بیماران دچار دیابت تیپI مورد بررسی قرار گرفت(۲، ۴، ۷و۸).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی با همکاری انجمن دیابت ایران، ۷۵ بیمار دچار دیابت تیپ I که حداقل ۲ سال از تشخیص قطعی بیماری آنان توسط پزشک متخصص غدد درون‌ریز گذشته بود که درمان نیز می‌شدند، شناسایی و پس از اخذ رضایت برای نمونه‌گیری انتخاب شدند.

گروه شاهد از اهداکنندگان سالم خون به سازمان انتقال خون ایران انتخاب شدند و پس از معاینه پزشک سازمان و گرفتن رضایت، برای شرکت در طرح تحقیقاتی، از آنان نمونه‌گیری انجام شد.

۵ میلی‌لیتر خون کامل از افراد بیمار و سالم گرفته شد. نمونه‌ها با EDTA مخلوط شد و تا خاتمه نمونه‌گیری و انجام آزمایش در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

DNA به روش استاندارد(۹) از خون‌های کامل استخراج و کیفیت آن براساس OD260/OD280 بررسی شد که در تمام آنها این نسبت بین ۱/۹-۱/۷ بود.

برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در موقعیت ۹۱۵+ ژن TGFβ به روش PCR-SSP، از پرایمری با توالی CGAGCCGCAGCTTGGACAGGAT به‌عنوان common reverse و دو پرایمر forward با توالی‌های ACTGGTGCTGACGCCTGTCCG و ACTGGTGCTGACGCCTGTCCC در لوله‌های مجزا استفاده شد(۹و۱۰).

برنامه PCR برای تکثیر قطعه ۱۱۶ جفت بازی توسط دستگاه Master cycler(eppendorf Germany) به این شرح بود:

۱ بار	۲ دقیقه	۹۵ درجه
	۲۰ ثانیه	۹۵ درجه
۵ بار	۱ دقیقه	۷۲ درجه
	۲۰ ثانیه	۹۵ درجه
	۲۰ ثانیه	۶۷ درجه
۲۵ بار	۴۰ ثانیه	۷۲ درجه
۱ بار	۵ دقیقه	۷۲ درجه

فرآورده‌های واکنشPCR با ژل آگارز ۲٪ و بروماید اتیدیوم و ترانس ایلومیناتور بررسی شدند. تجزیه و تحلیـــل داده‌ها با نرم‌افزارSPSS و آزمون مربع کای با

حدود اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

نتایج

ویژگی‌های دموگرافی گروه بیمار و شاهد در جدول ۱ نشان داده‌شده‌است. برای بررسی بیشتر بیماران، مبادرت به اندازه‌گیری مقدار Hb A1c نمودیم که در زنان ۶/۴٪ و در مردان ۶/۷٪ بدست آمد.

در جدول ۲ توزیع ژنوتیپ TGFβ در نوکلئوتید ۹۱۵+ در کدون ۲۵ آورده‌شده‌است. مقایسه نتایج با آزمون آماری مربع کای در گروه شاهد و بیمار نشان داد که تفاوت معنی‌داری در نحوه توزیع ژنوتیپ‌های مختلف بین دو گروه وجود ندارد.

جدول ۱: مشخصات افراد مورد مطالعه در دو گروه بیمار(دیابتی) و شاهد(سالم)

گروه ها / متغیرها		بیمار(دیابتی) n=۷۵	شاهد(سالم) n=۸۸
جنس	مرد تعداد (درصد)	۳۲ (۴۲/۷)	۵۰ (۵۶/۸)
	زن تعداد (درصد)	۴۳ (۵۷/۳)	۳۸ (۴۳/۲)
میانگین سنی (سال)		۱۵	۲۰
میانگین‌سن‌شروع بیماری (سال)		۷/۳	-
میانگین‌زمان‌ابتلا به‌بیماری(سال)		۹/۹	-

جدول ۲ : توزیع ژنوتیپ جایگاه ۹۱۵+ کدون ۲۵ ژن $TGFβ_1$ در افراد دیابتی و سالم

گروه ها		ژنوتیپ	P Value
بیمارتعداد(درصد)	سالم‌تعداد(درصد)		
۶۶ (۸۹/۴)	۸۰ (۹۱)	GG	> ۰/۰۵
۶ (۸)	۶ (۶/۶)	GC	> ۰/۰۵
۳ (۲/۶)	۲ (۲/۴)	GC	> ۰/۰۵

بحث و نتیجه گیری

دیابت نوعI خودایمن است که در آن لنفوسیت‌های Th1 و Th2 نقش مهمی ایفا می‌کنند(۲). محققان مختلف درباره نقش سیتوکین‌های متعدد در دیابت نوعI بررسی‌های گوناگونی انجام داده‌اند(۴) که در این میان TGF-β از مهم‌ترین سیتوکین‌هایی است که لنفوسیت‌های Th تولید می‌کنند(۱۱). حدود ۲۰ نوع موجود TGF-β بررسی شده است(۲). برخی از پلی‌مرف‌های آن در اتیولوژی دیابت تیپI و برخی دیگر در بروز عوارض متعدد آن مثل عوارض کلیوی، قلبی، چشمی و عصبی نقش دارند(۱۵-۱۲).

TGF-β کدون‌های متعددی دارد. پلی‌مرفیسم در برخی کدون‌ها با جنبه‌های مختلف دیابت ارتباط دارد. مطالعه همزمان پلی‌مرفیسم کدون‌های مختلف اطلاعات جامع‌تری به دست می‌دهد اما این کار به‌دلیل هزینه گزاف و امکانات محدود عملی نیست. لذا بسته به مورد، کدون یا کدون‌های خاصی را بررسی می‌کنند.

مقایسه نتایج در گروه‌های بیمار شاهد نشان داد که آلل‌های متفاوت در کدون ۲۵ نقشی در بروز دیابت تیپI ندارد،اما درمطالعه Patel و همکاران بر کدون‌های ۱۰،۲۵ و ۲۳۶ نشان داده شد که کدون ۱۰ نقش قابل ملاحظه‌ای در ایجاد نفروپاتی ناشی از دیابت دارد در حالی که در پلی‌مرفیسم کدون‌های ۲۵ و ۲۶۳ اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به افراد سالم بدست نیامد(۹).

محققان مختلف در بررسی‌های خود ارتباط بین کدون ۲۵ و افزایش فشار خون را نشان داده‌اند و اخیراً نیز Branek و همکاران در دیابت نوع I ارتباط رتینوپاتی و کدون ۲۵ را بدست آورده‌اند، اما هیچ ارتباطی بین کدون ۲۵ و نفروپاتی دیده نشد(۱۶). برخی بررسی‌ها نقشTGF-β را در بروز عوارض فیبروتیک ریه نشان داده‌است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که برخی از کدون‌های TGF-β نقش مهمی در ایجاد عوارض ناشی از دیابت نوعI به عهده دارند(۲۱-۱۷). درمطالعه ما ۸۹/۲٪ بیماران فرم GG، ۸٪ فرمGC و ۲/۶٪ فرم CC را در کـدون ۲۵ نوکلیوتید۹۱۵+ نشان دادند که از نظر

آماری با افراد سالم اختلاف معنی‌دار نداشت (p value>۰/۰۵).

از طرف دیگر بررسی ما ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مرفیسم کدون ۲۵ ژن TGF-β وHbA1c چه در زنان و چه در مردان نشان نداد. به عبارت دیگر از نظر آماری بین افزایش یا کاهشHbA1c و TGF-β ارتباط معنی‌دار دیده‌نمی‌شود(p value>۰/۰۵) لذا پلی‌مرفیسم در ناحیه ۹۱۵+ کدون ۲۵ ژن TGF-β نمی‌تواند عامل خطر یا متغیر پیش‌گویی‌کننده در بروز دیابت تیپ I قلمدادشود.

احتمال دارد تحقیقات بعدی بتواند نقش کدون ۲۵ و کدون‌های دیگر را در بیماری‌زایی و ایجاد عوارض متعـدد در این بیماران نشان دهد.

تشکر و قدردانی: این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده‌است و انجمن دیابت ایران و سازمان انتقال خون ایران مساعدت فراوانی در نمونه‌گیری مبذول نموده‌اند که بدین‌وسیله کمال تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Vence MDL, Benoist C. beta-Cell Death During Progression to Diabetes. Nature 2001; 414(6865): 792-8.

2.Gregg RK, et al. A Sudden Decline in Active Membrane-bound TGF-Beta Impairs Both T Regulatory Cell Function and Protection against Autoimmune Diabetes. J Immunol 2004; 173(12): 7308-16.

3.Mukherjee R, et al. Regulation of Type 1 Diabetes by a Self-MHC Class II Peptide: Role of Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2003; 49(2): 159-69.

4.Bidwell J, et al. Cytokine Gene Polymorphism in Human disease: On-Line Databases, Supplement 1. Genes Immun 2001; 2(2): 61-70.

5.Eerligh, P, et al. Functional Genetic Polymorphisms in Cytokines and Metabolic Genes as Additional Genetic Markers for Susceptibility to Develop Type 1 Diabetes. Genes Immun 2004; 5(1): 36 40.

6.Haukim N, et al. Cytokine Gene Polymorphism in Human Disease: On-Line Databases, Supplement 2. Genes Immun 2002; 3(6): 313-30.

7.Kallmann B A, et al. Cytokine Secretion Patterns in Twins Discordant for Type I Diabetes. Diabetologia 1999; 42(9): 1080-5.

8.Atilla G, et al. TGF-Beta1 Gene Polymorphisms in Periodontal Diseases. Clin Biochem 2006; 39(9): 929-34.

9.Patel A, et al. The TGF-Beta 1 Gene Codon 10 Polymorphism Contributes to the Genetic Predisposition to Nephropathy in Type 1 Diabetes. Diabet Med 2005; 22(1): 69-73.

10. Du W, et al. TGF-Beta Signaling is Required for the Function of Insulin-Reactive T Regulatory Cells. J Clin Invest 2006;116(5): 1360-70.

11. Santilli CFF, Mohn A. Role of Growth Factors in the Development of Diabetic Complications. Horm Res 2000; 53(2): 53-67.

12. Flores L, et al. Transforming Growth Factor Beta at Clinical Onset of Type 1 Diabetes Mellitus. A Pilot Study. Diabet Med 2004; 21(8): 818-22.

13.Ziyadeh FN, Sharma K. Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Glomerulosclerosis and Renal Hypertrophy. Kidney Int Suppl 1995; 51 S34-6.

14.Huang C, et al. Cellular Basis of Diabetic Nephropathy: II. The Transforming Growth Factor-Beta System and Diabetic Nephropathy Lesions in Type 1 Diabetes. Diabetes 2002; 51(12): 3577-81.

15.Hellmich B, et al. Activation of Transforming Growth Factor-Beta1 in Diabetic Kidney Disease. Metabolism 2000; 49(3): 353-9.

16.Beranek M, et al. Polymorphism R25P in The Gene Encoding Transforming Growth Factor-Beta (TGF-beta1) is A Newly Identified Risk Factor for Proliferative Diabetic Retinopathy. Am J Med Genet 2002; 109(4): 278-83.

17.Kang MJ, et al. Effects of Diabetes and Hypertension on Glomerular Transforming Growth Factor-Beta Receptor Expression. Kidney Int 2000; 58(4): 1677-85.

18. Border WA, Noble NA. Evidence that TGF-Beta Should be a Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy. Kidney Int 1998; 54(4): 1390-1.

19.Tsiavou, A, et al. TNF-Alpha, TGF-Beta1, IL-10, IL-6, Gene Polymorphisms in Latent Autoimmune Diabetes of Adults (LADA) and Type 2 Diabetes Mellitus. J Clin Immunol, 2004. 24(6):591-9.

20.Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and Their Roles in Pancreatic Islet Beta-Cell Destruction and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Biochem Pharmacol 1998; 56(8): 1139-49.

21.Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, Stress, and Diabetes. J Clin Invest 2005; 115(5): 1111-9.

Survey the Single Nucleotide Polymorphism of TGFβ at Codon 25 in Type 1 Diabetic Patients

Masood M.(MD), Salehi I.(Ph.D), Sheykh Bahayi N.(Ph.D), Vojgani M.(Ph.D), Rajab A.A.(MD), Massoud A.(Ph.D)

Abstract

Introduction: Type 1 diabetes is an autoimmune disease which is characterized by T-cell mediated destruction of pancreatic β-cells. A variety of environmental and genetic factors are involved in the development of the disease.

Transforming Growth Factor Beta-1 (TGFβ) is a multifunctional cytokine that affected regulation and difference of immune responses and there is abnormal secretion of this auto immune disease.

Genetic polymorphisms in the TGFβ gene influenced production and secretion of cytokine and figured as a risk factor in auto immune disease.

Objective: In this study, single nucleotide polymorphism of TGFβ at codon 25is investigated in type 1 diabetic patients and compared with healthy controls.

Materials and Methods: This was a case control study which 75 type 1 diabetic patients who had definitely diagnosed at least 2 years before sampling and were under Insulin therapy were selected. Control group were selected from voluntarily blood donors who had referred to IRAN Blood Transfusion Organization.

Data were analyzed by SPSS and using chi- square test with 95% confidence interval.

Results: The findings showed that there were not statistically significant differences in G C polymorphism at +915 between cases and control groups (p value 0.05).

Conclusion Although TGFβ polymorphism at +915 regions affects the production of cytokine regulates immune responses; this study showed that single nucleotide polymorphism in this region can not be involved in onset of type 1diabetes and can not be considered as risk factor.

Key words: Diabetes Mellitus, Insulin- Dependent/ Nicleotides/ Transforming Growth Factor Beta