مجله دیابت و لیپید ایران. بهار و تابستان ۱۳۸۳؛ دوره ۳ (شماره ۲):۱۰۷-۱۱۱

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط بین پلی مرفیسم ژن اینترفرون گاما با دیابت نوع ۱ در بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم در نیم‌سال اول ۸۲

محمد حسین نیکنام*[۱]، علی رفیعی نژاد[۱]، علی اکبر امیر زرگر[۱]، فریده خسروی[۱]، باقر لاریجانی[۲].

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 15:36 IRST on Monday November 20th 2017

چکیده

مقدمه: دیابت نوع ۱(T1 DM) بیماری خود ایمن مزمن وپیشرونده است که دراثر تخریب سلولهای بتای جزایر لانگرهانس با واسطه پاسخ های ایمنی پدید می‌آید. اتیولوژی دیابت نوع یک مانند دیگر بیماریهای خود ایمنی ناشناخته است و عوامل متعددی در بروزآن دخالت می‌کنند.هردونوع پاسخ ایمنی و هومورال و سلولی ، در پاتوژنز بیماری نقش اساسی دارند . سیتوکاین ها به‌عنوان پپتیدهای ایمونومدولاتوری مسؤول بسیج سلول های ایمنی و تولید خودپادتن‌ها توسط سلولهای اجرایی هستند. برای ارزیابی نقش پلی مرفیسم ژنهای سایتوکاین‌ها در ایجاد حساسیت و یا مقاومت در برابر بیماری دیابت نوع ۱ ،ما IFN γ را انتخاب کردیم و همراهی پلی مرفیسم ژن آن را با T1DM بررسی کردیم .

روشها: در این بررسی ۳۰ بیمار مبتلا بهT1DM و ۴۰ فرد سالم به‌عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند . تکنیک PCR جهت تعیین پلی مرفیسم ژن IFN γ بکار گرفته شد .جدا سازی DNA بر اساس روش salting out انجام گرفت. ژن IFN γ در موقعیت ۵`UTR+5644 بررسی شد نتایج حاصل از PCR به‌کمک ژل الکتروفورز ارزیابی گردید.

یافته‌ها: حاصل مطالعه ما نشان می‌دهد که بین گروه بیمار و گروه شاهد ما اختلاف معنی داری در بروز آلل TT ژن IFN γ وجود دارد .$p<0.05$ و $RR:0.39(0.22<RR<068)$ و از آنجا که $OR <1$ است ، این رابطه از نوع منفی میباشد .

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ما یک رابطه منفی بین ژن IFN γ در موقعیت `UTR+5644 `5 و بیماری دیابت نوع ۱ در گروه مورد بررسی یافته ایم و از این جهت می‌توان تصور کرد که که بروز آلل TT در ژن IFN γ می‌تواند از بروز دیابت جلوگیری کند

کلید واژه‌ها: دیابت نوع ۱، پلی مورفیسم ژن، سیتوکین‌ها

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- استاد بیماریهای غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز ومتابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی:*** تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 15:36 IRST on Monday November 20th 2017

مقدمه

دیابت قندی شامل دسته‌ای از اختلالات متابولیک است که در آن کمبود انسولین، مقاومت به انسولین و افزایش تولید گلوکز باعث هیپرگلیسمی و عوارض متعدد آن می‌شود. شیوع این بیماری در سطح دنیا رو به افزایش است و احتمالاً یکی از علل مهم بیمارگینی (morbidity) و مرگ و میر باقی خواهد ماند. دو نوع اصلی آن، نوع ۱ و نوع ۲ است. در دیابت نوع ۱، عوامل ژنتیک، محیطی(مانند ویروس ها) و ایمونولوژیک باعث تخریب سلولهای بتای جزایر لانگرهانس پانکراس و کمبود مطلق انسولین می‌شوند[۱]. از عوامل ایمونولوژیک، ایجاد واکنش بیش‌حساسی تأخیری (delayed hypersensitivity) توسط سلولهای Th1[1] CD4+ در برخورد با خودپادزاهای(autoantigens) سلولهای بتا، سیتوتوکسی‌سیتی توسط سلولهای CD8+ و ترشح سیتوکین‌های التهاب‌زا و خودپادتن(autoantibody)ها را می‌توان نام برد[۲-۴]. سیتوکین‌های التهاب‌زا در مراحل ابتدایی بیماری و پیدایش عوارض شدید آن نقش کلیدی بازی می‌کنند. از جمله این سیتوکین‌ها، اینترفرون گاما (IFN-γ) را می‌توان نام برد.

اینترفرون گاما گلیکوپروتئینی به وزن ۲۰ کیلودالتون است که ژن آن روی کروموزوم 12q14 واقع شده و دارای ۶ کیلو جفت باز است. این سیتوکین از سلولهای T و NK[2] در پاسخ به تحریکات محیطی(نظیر ویروسها) ترشح شده و می‌تواند بر همه سلولها اثر بگذارد. از اعمال آن می‌توان تحریک ترشح ایمونوگلوبولین‌ها توسط سلولهای B، افزایش بیان MHC II[3] بر سطح سلولها، افزایش اپسونیزاسیون در ماکروفاژها و قدرت کشندگی آنها و نیز تمایز سلولهای Th1 در اثر تحریک ترشح IL-2 را می‌توان نام برد [۵].

ژن IFN-γ و به‌طور کلی ژن سیتوکین‌ها و گیرنده‌های آنها و در نتیجه توالی (sequence) اسیدهای آمینه آنها به‌ندرت دستخوش تغییرات(پلی مورفیسم) می‌شوند[۶،۷]. اغلب پلی‌مورفیسم‌های این ژنها در نواحی تنظیم کننده (ناحیه پروموتور، اینترون ها، 3' & 5' UTR) اتفاق می‌افتند و می‌توانند در میزان ترشح سیتوکین‌ها و در نتیجه در روند بیماری و استعداد ابتلای شخص به بیماری اثر بگذارند[۸،۹]. ما در مطالعه خود، ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن سیتوکین IFN-γ و دیابت نوع ۱ را بررسی می‌کنیم.

روشها

بیماران

سی بیمار مبتلا به دیابت نوع یک (۱۶ مؤنث و ۱۴ مذکر) از مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم به طور تصادفی انتخاب شدند. مدت بیماری این افراد بین ۳ تا ۱۸ ماه بود. *معیارهای ورود*: کسانی که برای آنها توسط پزشک متخصص در درمانگاه مرکز تحقیقات طبق معیارهای NDDG[4] آمریکا تشخیص دیابت نوع۱ گذاشته شده بود. *معیارهای خروج* : کسانی که مایل به ورود به طرح نبودند. ۴۰ نفر سالم (بدون علایم دیابت) به عنوان گروه شاهد به مطالعه ما وارد شدند.

روش بررسی :

۱) *استخراج DNA* : ۵ سی سی از خون بیماران با ضدانعقاد EDTA ترکیب شده و جهت استخراج DNA آن از روش salting out استفاده شد[۱۰].

۲) *Cytokine typing* : برای این‌کار از روش PCR-SSP استفاده شد. دستگاه مورد استفاده PCR 9600 و کیت های آنPCR-SSP tray kit متعلق به دانشگاه هایدلبرگ آلمان بودند[۱۱].

مراحل PCR به ترتیب زیر انجام شدند :

دناتوراسیون اولیه ۲ دقیقه در ۹۴ درجه ؛ دناتوراسیون ۱۰ ثانیه در ۹۴ درجه ؛ آنیلینگ (Anealing)و اکستانسیون(extension) ۱ دقیقه در ۶۵ درجه (۱۰ سیکل)؛ دناتوراسیون(Denaturation) ۱۰ ثانیه در ۹۴ درجه؛ آنیلینگ ۵۰ ثانیه در ۶۱ درجه؛ اکستانسیون ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه (۲۰ سیکل) (جدول یک).

---

[1] T helper cells
[2] Natural killer cells
[3] Major compatibility complex
[4] National Diabetes Data Group

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 15:36 IRST on Monday November 20th 2017

برای موقعیت مورد مطالعه، یک جفت پرایمرمختص آن موقعیت و یک جفت پرایمر شاهد که قسمتی از ژن بتا گلوبولین یا ژن CRP را تکثیر می‌کند، لازم بود[۱۱].

توالی پرایمرها به قرار زیر است :

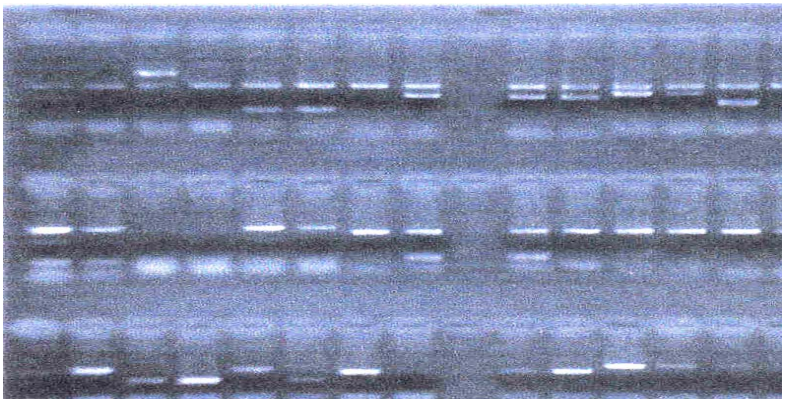
forward(5`GACATTCACAATTGATTTTATTCTT AC-3`)

reverse(5`GCCTTCCTGTAGGGTATTATTATAC-3`)

برای مشاهده محصولات PCR ، الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ انجام شد. بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل به دستگاه ترانس ایلومیناتور ماورای بنفش منتقل شد و عکس پولاروید تهیه شد (شکل ۱). فرکانس آلل‌های موقعیت 5’ UTR +5644 ژن IFN-γ در گروه بیمار و شاهد به طریق شمارش ژنی مستقیم بررسی شد. یافته‌ها با استفاده از آزمون مجذورکای مقایسه شدند.

یافته‌ها

فرکانس آلل‌های A/T موقعیت 5’UTR +5644 ژن IFN-γ در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ و گروه شاهد در جدول و شکل دو نشان داده شده است.



شکل۱- شمای الکتروفورز محصولات PCR

جدول۱- مراحل مختلف انجام آزمایش PCR

دما(درجه سلسیوس)*	زمان	مرحله	تعداد دور
۹۴	۱۲۰ ثانیه	Initial denaturation	cycle ۱
۹۴	۱۰ثانیه	Denaturation	
۶۵	۶۰ ثانیه	Annealing +extension	cycle ۱۰
۹۴	۱۰ثانیه	Denaturation	
۶۱	۵۰ثانیه	annealing	
۷۲	۳۰ ثانیه	extension	cycle ۲۰

*پس از انجام PCR نمونه ها تا زمان الکتروفورز باید در ۴+ سلسیوس نگهداری شوند

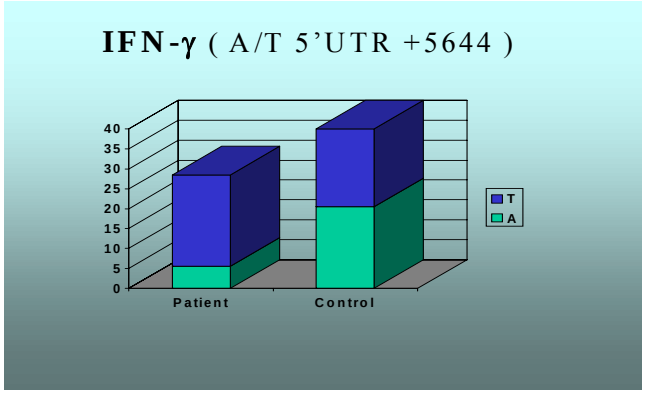
جدول۲- فرکانس آلل های A/T در موقعیت 5’UTR +5644 ژن اینترفرون گاما

IFN-γ.:5’UTR +5644	بیماران	شاهد
آدنین	۱۱	۴۱
تیمین	۴۶	۳۹

مجذور کای=۱۴/۴۳، مقدارP= ۰/۰۰۱ ، خطر نسبی(relative risk)= ۰/۳۹(بین ۰/۲۲ و ۰/۶۸).

نسبت شانس (odds ratio)= ۰/۲۳(بین ۰/۱ و ۰/۵۳)

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 15:36 IRST on Monday November 20th 2017



شکل ۲- فرکانس آلل های A/T در موقعیت 5'UTR +5644 ژن اینترفرون گاما

در این مطالعه ملاحظه می‌کنیم ارتباط معنی‌داری بین دو گروه بیمار و شاهد وجود دارد. به عبارتی، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ TT در موقعیت 5' UTR +5644 ژن IFN-γ و بیماری دیابت نوع ۱ وجود دارد و با توجه به نسبت شانس کوچکتر از ۱ (OR<1) این ارتباط از نوع منفی (negative association) است یعنی داشتن این ژنوتیپ می‌تواند نقش محافظت‌کننده در برابر ابتلا به دیابت نوع ۱ داشته باشد.

بحث

در این مطالعه پلی‌مرفیسم ژن سیتوکین اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ بررسی شده است. نقش سیتوکین‌ها درآسیب‌زایی (pathogenesis) دیابت نوع۱ در تحقیقات زیادی نشان داده شده است[۱۳،۱۲]. IFN-γ یک سیتوکین ایمونومدولاتور است که بر روی کارکرد دستگاه ایمنی اثر فراوانی دارد و در موارد التهاب میزان ترشح آن افزایش می‌یابد[۱۴] . پلی‌مورفیسم ژن این سیتوکین می‌تواند در میزان ترشح آن و روند بیماری اثر بگذارد. پلی‌مورفیسم‌های متعددی برای این ژن کشف شده‌اند[۱۵-۱۷]. نتایج بررسی ما روی موقعیت 5'UTR+5644 سیتوکین IFN-γ نشان می‌دهد که ژنگون TT با بیماری دیابت نوع ۱، دارای رابطه منفی است و درنتیجه احتمالاً می‌تواند مانع از پیدایش بیماری گردد . گزارش Siekiera [۱۸] با بررسی ما تطابق دارد و نشان می‌دهدکه در کودکان مبتلا به دیابت نوع۱، ژنگون TT به میزان کمتری دیده می‌شود . پوسیت (Pociot) [۱۹] که در بیماران دانمارکی، میکروساتلیت‌های IFN-γ را بررسی کرده است، معتقد است که بین حضور این ژن ها و بیماری دیابت رابطه‌ای وجود ندارد.آواتا (Awata) [۲۰] در مقاله خود ژن اینترفرون گاما را یک نشانگر ژنتیکی خوب برای دیابت نوع۱ معرفی نموده است.

با توجه به این اصل که ژن ها می‌توانند در ایجاد حساسیت یا مقاومت به یک بیماری خاص مؤثر باشند، حضور یک ژنوتیپ خاص از یک سیتوکین نیز می‌تواند در جهت یکی از این دو حالت ذکر شده نقش داشته باشد؛ همچنان‌که حضور ژن HLA DR3 سبب حساسیت به بیماری دیابت و ژن HLA DR2 باعث مقاومت به آن می‌شوند. ژنگون TT سیتوکین اینترفرون گاما احتمالاً قادر است از پیدایش بیماری ممانعت نماید.

مطالعه در گروه‌های بزرگتر و بین فامیلی می‌تواند به تأیید این نظریه کمک نماید و در نتیجه امکان بررسی افراد مستعد یا مقاوم در خانواده مبتلایان و درمانهای پیشگیرانه را فراهم کند.

مآخذ

1. Powers AC .Diabetes Mellitus ; in: (*Harisons' principles of Internal Medicine* edited by Eugene Braunwald, 15th edition .McGraw-Hill publisher New york ; 2001, PP 2109-2137.

2. Yazdchi L, Rafiei S. Oral administration of E.coli GAD has immunomodulatory effects in diabetes. *Microbes* 2000; 102: 326-59.
3. Gottlieb PA,Eisenbrth GS. Human autoimmune diabetes In: *The Molecular Pathology of Autoimmune Disease*. Theopilopoulous. Tylor & Francis Publishing; 2002. p 588-613.
4. Abbas AK. *Celluar and Molecular immunology*. 10th edition Saunders publisher philadelphia 2003 , PP:243-273.
5. Sundy JS. Patel DD. Cytokines in normal and pathogenic inflammatory responses. In (Inflammation) edited by Gallin JI. Lippincott Williams & Wilkins publisher. Philadelphia 1999. p 433-41.
6. Kevan C. Sarne H. *Autoimmune Endocrine Disorders*. In: Autoimmune disease, edited by Lahita RG. Lippincott publishing; 2000.p 391-401.
7. Bidwell J.Keen L . Cytokine gene polymorphism in human disease supplement 1. *Genes and Immunity* 2001; 2: 61-70.
8. Chevillard C. Henri S.Two new polymorphisms in the human IFN-γ. promoter region. *European Journal of Immunology* 2002; 3: 165-9.
9. Lio D.Marino V. Genotype frequencies of the +874 (T ---> A) single nucleotide polymorphism in the first intron og the IFNgamma gene is sample of Sicillian patients affected by tuberculosis. J. Immun. genet. 2002; 29:371-4.
10. Miller SA..DykesD.A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells .Nucleic Acids Research 88;16:1215.
11. Uboldi de Capei M.Dametto E.Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *European Journal of Immunogenetics* 2003; 30: 5-10.
12. Konenkov VI., Prokofiev VF. Polymorphism of immune response genes as a factor for predisposition to development of diseases. *Russian journal of immunology* 2001; 6: 124-130.
13. Akalin E.Murph B. Gene polymorphism and Transplantation . Curr.Opinion in immun 2001 , 13:572-576.
14. Provica V.Perry C. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFNgamma gene, absoute correlation with a polymorphic CA micro-satellite marker of high IFN gamma production . Human immun.2000;6:863-6.
15. Henri S.Stefani F.Description of three new polymorphism in the intron and 3'UTR region of the human IFNgamma gene. *Genes Immu* 2002; 3: 1-4.
16. Iwasaki H.Ota N. Five novel SNP polymorphisms of human IFNgamma, identified by sequencing the entire gene. *Human Genetics* 2001; 46: 32-4.
17. Bream JH.Ping A. A single Nucleotide polymorphism in the proximal IFN gamma promoter region alters control of gene transcription. *Genes Immunology* 2002; 3: 165-9.
18. Siekiera U.Jorosz-chobat p. Polymorphisms of TNFα,IL-10,IL-6,IFN-γ genetically conditioned synthesis in children with T1DM. Endokrynol Diabetiol Chor.Przemiari Wieku Rozw 2002; 8: 29-34.
19. Pociot F.Veijola R. Analysis of IFN-γ gene polymorphism in Danish & Finish IDDM patients and control subjects.J.Interferon Cytokine Res. 1997;17:87-93.
20. Awata T. Matsuma C. Association of polymorphisms of IFN gamma with IDDM . *Diabetologia* 1994; 37: 1159-62.

Downloaded from ijdld.tums.ac.ir at 15:36 IRST on Monday November 20th 2017