مجله دیابت و متابولیسم ایران. مهر- آبان ۱۳۹۵؛ دوره ۱۶ (شماره ۱) ۱۶-۹

مقاله‌ی پژوهشی

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم Thr399Ile از ژن TLR4 در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه کننده به کلینیک تخصصی وفوق تخصصی دیابت وبیماری‌های متابولیک تهران

شراره حسن زاده[۱]، عباسعلی راز[۲]، معصومه منصوری[۳]، زهرا میرزایی زاده [۴]، باقر لاریجانی[۵]، مهرداد هاشمی[۱]، کبری امیدفر[۴]*

چکیده

مقدمه: دیابت نوع دو یک اختلال متابولیکی است که با افزایش قند خون می‌تواند به اعصاب آسیب بزند. در این میان اندام‌های بسیاری تحت تأثیر قرار می‌گیرند، به‌ویژه پا که آسیب منجر به درد و در نهایت از دست دادن حس لامسه در این اندام می‌گردد که این عوامل، شرایط را برای ابتلا به زخم پای دیابتی مساعد می‌سازند. پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) از ژن Toll Like Receptor4 (TLR4) سبب نقص در عملکرد پروتئین TLR4 که یک پروتئین مهم تنظیم کننده‌ی التهاب زخم است می‌گردد. این مطالعات با هدف بررسی پارامترهای تأثیر گذار بر عدم تعادل برنامه‌ی ضد التهاب و در نتیجه مزمن شدن التهاب و عدم بهبود زخم بنا گردیده است و در صورت تأیید همبستگی پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) با زخم پای دیابتی می‌توان از آن به‌عنوان مارکر زیستی پیش آگاهی دهنده استفاده کرد.

روش‌ها: این مطالعه از نوع مورد – شاهد است. پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) از ژن TLR4 در ۱۰۰ بیمار دیابتی دارای زخم در گروه مورد و ۱۲۰ بیمار دیابتی فاقد زخم در گروه شاهد با استفاده از تکنیک Tetra ARMS PCR تعیین ژنوتیپ گردید.

یافته‌ها: آزمون Chi-square بین دو گروه شاهد و مورد، از نظر آماری یک اختلاف معنی‌دار را در فراوانی ژنوتیپ‌های (CC)، (TT) و(CT) متعلق به پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) نشان داد (P=0.021).

نتیجه‌گیری: یک ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) از ژن (TLR4) و خطر ابتلا به زخم پای دیابتی در بین افراد مبتلا به دیابت نوع دو وجود دارد.

واژگان کلیدی:TLR4 ، پلی‌مورفیسم، زخم پای دیابتی

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده‌ی علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده‌ی علوم سلولی-مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- مرکز تحقیقات دیابت، پژوهشکده‌ی علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* ***نشانی:*** تهران، خیابان کارگر شمالی بیمارستان دکتر علی شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نشانی پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۱۲ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۵/۰۸/۱۰** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۰**

مقدمه

شیوع دیابت در حال حاضر در کشور ما آماری حدود ۴/۵ تا ۵ میلیون نفر را به خود اختصاص داده است که حدود ۵۰٪ از این جمعیت از بیماری خود اطلاعی ندارند [۱].

در بیماری دیابت بدن توانایی ساخت انسولین (دیابت نوع یک) و یا استفاده کارآمد از آن را از دست می‌دهد (دیابت نوع دو) [۲] به‌واسطه این نقص، قند خون افزایش پیدا می‌کند و این شرایط با واژه‌ی هایپرگلیسمی[1] توصیف می‌شود. تخریب ریزرگ‌ها یکی از عوارض بالا بودن قند خون برای مدت زمان طولانی است که باعث آسیب به اعضای مختلف بدن می‌شود [۳]. برای مثال آسیب به اعصاب که اندام‌های بسیاری از جمله پا را به چالش می‌کشاند [۴]. بالای ۲۵ درصد از افراد مبتلا به دیابت نوع دو حداقل یک بار به زخم پای دیابتی مبتلا می‌شوند. در حدود ۸/۶۹ درصد کل هزینه‌های سلامت در ایران برای کنترل بیماران دیابتی نوع دو مصرف می‌گردد.

عوارض منتسب به بیماران دیابت نوع دو مسؤول ۱/۰۰۲ میلیارد از هزینه‌های سلامت هستند که بیش از ۴/۲۵ درصد کل هزینه‌های بهداشتی کشور است. سرانه‌ی هزینه‌های مستقیم در بیمارانی که مبتلا به یک یا چند عارضه هستند دو برابر بیش‌تر از بیمارانی است که بدون عارضه‌اند هرچند پیشرفت‌های حاصله در زمینه‌ی درمان زخم پا چشم‌انداز امیدوار کننده‌ای برای بیماران ایجاد کرده است اما پیشتر، این درمان‌ها به شکل مکمل کارآمد بوده‌اند و اثرات نسبی داشته‌اند و بیماران را مجبور به تقبل هزینه‌های فراوان کرده‌اند. بنابراین مشخص نمودن افراد با خطر بالای ابتلا به زخم پای دیابتی از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا به این وسیله می‌توان عوارض ابتلا به بیماری را تا حد زیادی کاهش داد. یافتن یک بیومارکر برای خطر ابتلا به زخم پا در بین افراد دیابتی، کمک می‌کند تا با شناسایی افراد مستعد، ماه‌ها یا حتی سال‌ها پیش از ظهور بیماری به آن‌ها و خویشاوندانشان هشدار داد تا با تغییر در روش زندگی و فاکتورهای محیطی کمک کننده به ایجاد زخم، تنظیم نمودن میزان قند خون و به‌طور کلی مدیریت نمودن بیماری، بروز علائم بیماری را به تأخیر انداخته و یا در صورت بروز، شدت بیماری در آن‌ها کاهش یابد [۲]. این مهم یک فرایند multidisciplinary است که بر پیشگیری آموزش و آزمایشات منظم پا متمرکز است و در مقایسه با درمان بیماری هم کم هزینه‌تر و هم آسان‌تر خواهد بود. لذا با برنامه‌ی کشور با پیشگیری و کنترل دیابت نیز تطابق خواهد داشت.

یکی دیگر از عوارض بیماری دیابت ناکارآمد شدن سیستم ایمنی بدن می‌باشد که باعث عدم بهبود زخم می‌گردد. یک زخم پای ساده دوران فاز التهابی خود را برای ترمیم در مدت کوتاهی طی می‌کند و از طریق فاز تکثیر به فاز بازسازی وارد شده و قدرت کافی برای بسته شدن زخم در زمان مناسب را پیدا می‌کند. هر عدم تعادلی در این فازها منجر به شرایطی می‌گردد که زخم توانایی خود را برای بهبود و بازسازی از دست می‌دهد و در نتیجه تبدیل به زخم مزمن می‌گردد. دیابت نوع دو منجر به کاهش فاکتورهای رشد و سیتوکان‌های لازم برای فاز تکثیر می‌گردد. افزایش سیتوکان‌ها در فاز پیش التهابی و افزایش آنزیم‌های از بین برنده‌ی ماتریکس باعث تخریب فاز بازسازی شده و از این رو مانع بهبود یافتن زخم می‌گردند. برای بهبود زخم، فاز التهابی باید به خوبی هماهنگ شده باشد و نباید با فازهای تکثیر و بازسازی تداخل داشته باشد [۵].

TLR4[2] یکی از بهترین نمونه‌ها برای معرفی پروتئین‌های سیستم ایمنی از خانواده (TLRs) می‌باشد [۶]، ژن TLR4 که بر روی کروموزوم ۹ قرار دارد از لحاظ سکانس به مقدار زیادی همولوژی با ژن Dtool در دروزوفیل دارد. TLR4 در فعال‌سازی پاسخ ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی شرکت دارد [۸، ۷]. TLR4 القاء کننده‌ی طیف گسترده‌ای از سیتوکین‌ها می‌باشد و در رگ‌زایی [۹]، ترمیم بافت [۱۰] و بازسازی [۱۱] نقش دارد.

TLR4 یک پروتئین پذیرنده و پیام‌رسان می‌باشد. مشخص شده است که التهاب مزمن با درجه‌ی کم و فعالیت سیستم

[1] Hyperglycemia

[2] Toll Like Receptor4

ایمنی در پاتوژنز مقاومت به انسولین وابسته به چاقی و دیابت نوع دو در ارتباط است. مارکرهای سیستمیک التهابی ریز فاکتورهای پیشرفت دیابت نوع دو و عوارض ماکرووسکولار آن محسوب می‌شوند. بافت چربی، کبد، ماهیچه و پانکراس جایگاه‌های التهاب در حضور چاقی می‌باشند. ترشح ماکروفاژها و سایرسلول‌های ایمنی به این بافت‌ها باعث می‌شود جمعیتی از سلول‌ها از حالت ضد التهابی به پیش التهابی تغییر حالت دهند و این سلول‌ها برای تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی ضروری هستند و این سایتوکاین‌ها به‌صورت اتوکرین و پاراکرین باعث تداخل در سیگنالینگ انسولین و نقص در القاء سلول‌های بتا می‌شوند که در نهایت هر دوی این عوامل باعث کمبود انسولین می‌شوند.

گیرنده TLR4، (LPS)ها را به‌عنوان لیگاند شناسایی می‌کند و در ماکروفاژهای سلول‌های اپیتلیوم راه هوایی، بافت چربی[1]، عضله اسکلتی، پانکراس، اندوتلیال عروقی و سلول‌های عضلانی صاف بیان می‌شود. همچنین با لیگاندهای درون‌زا مانند اسید های چرب آزاد، پروتئین‌های شوک حرارتی ۶۰[2] و ۷۰ و فیبرینوژن و فیبرینونکتین که در بیماران دیابتی سطح بالایی دارند در تعامل می‌باشد و پس از فعال‌سازی باعث سیگنالینگ آبشار التهابی، تولید سایتوکین‌های التهابی، آزادسازی پپتیدهای آنتی‌میکروبیال و فعال‌سازی پاسخ سیستم ایمنی تطبیقی می‌شود [۱۴-۱۲].

علاوه بر این به‌نظر می‌رسد فعالیت TLR4 یک نقش حیاتی در پاتوژنز IR[3] و شرایط تجربی و بالینی بیماری دیابت نوع دو ایفا می‌کند. همچنین TLR4 به‌عنوان بالا دست فاکتورهای رشد مختلف در آماده‌سازی زخم برای بهبود یافتن شرکت دارد. برای مثال یکی از این gf ها (VEGF)[4] می‌باشد که یکی از عضوهای آبشار بهبود زخم است [۱۵] و با توجه به نقش آن به‌عنوان میتوژن برای سلول‌های اپیتلیال و القاء کننده‌ی نفوذپذیری عروق، (VEGF) به‌صورت بارز باعث ترویج عوامل بهبود زخم مثل (رگ‌زایی و رسوب کلاژن) می‌گردد [۱۶].

فعالیت TLR4 همچنین مسؤول بیان و تنظیم (VEGF) می‌باشد، از این رو مقدار بیان پایین TLR4 در دیابتی‌ها باعث عدم بهبود زخم و عدم تنظیمات درست و بیان کافی (VEGF) می‌گردد [۱۸، ۱۷].

بنابر این ما فرض می‌کنیم میزان بیان مختلف یا کم TLR4 ممکن است باعث عدم بهبود زخم در اندام های تحتانی افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ گردد [۷].

هدف پروژه حاضر تعیین چند شکلی‌های ژن TLR4 و ارتباط آن با زخم پای دیابتی و محاسبه میزان خطر ابتلا در صورت تایید همبستگی می‌باشد. مطالعه‌ی ما برروی پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) انجام گرفت. این پلی‌مورفیسم در سومین اگزون از ژن TLR4 قراردارد. براساس بررسی‌های محققین تا کنون مطالعه‌ای بر زمینه‌ی ارتباط واریانت‌های ژنتیکی این ژن با زخم پای دیابتی صورت نگرفته است و این مطالعه برای اولین بار در کشور ما انجام شده است.

روش‌ها

این پژوهش به روش مورد-شاهد انجام شده است و با توجه به معیارهای ورود به مطالعه، تعداد۲۲۰بیمار، شامل ۱۰۰ نفر در گروه مورد و ۱۲۰ نفر در گروه شاهد، تحت نظر پزشک از بیماران دیابتی مراجعه کننده به کلینیک تخصصی دیابت و بیماری‌های متابولیک دانشگاه علوم پزشکی تهران، جمع‌آوری گردید. گروه مورد، شامل بیماران دیابتی با زخم پای دیابتی درجه ۱ یا ۲ مطابق با طبقه‌بندی وگنر و گروه شاهد، بیماران دیابتی بدون زخم پا و یا سابقه‌ی ابتلا به زخم پای دیابتی بودند. معیارهای ورود به مطالعه عبارتند از ابتلا به دیابت نوع دو، سن بالای ۴۰ سال، زخم پا با درجه ۱ یا ۲ براساس طبقه‌بندی وگنر و معیارهای خروج از مطالعه عبارتند از زخم پا با درجه ۳ یا ۴ از طبقه‌بندی وگنر، مصرف مکمل‌های ویتامینی (ویتامین B۱۲ و اسید فولیک)، کراتین بالای ۲mg/dl، سیروز کبدی، sever retinopathy، نارسایی قلبی

[1] Adipose tissue
[2] Heat shock protein
[3] Insulin Resistance
[4] VascolarEndothelial Growth Factor

کلاس ۳ یا۴ (براساس NYHR) و وجود سایر بیماری‌هایی که منجر به نوروپاتی به غیر از دیابت می‌شود. برای تمامی افراد داوطلب جهت شرکت در طرح، فرم شرح حال اطلاعات عمومی و بالینی توسط پژوهشگر تکمیل گردیده و نمونه‌ی خون کامل افراد در لوله‌های حاوی EDTA جهت بررسی‌های ژنتیکی جمع‌آوری شد. در پژوهش حاضر، کلیه‌ی اصول اخلاقی توسط کمیته‌ی اخلاق پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها: ابتدا استخراج لنفوسیت براساس روش Harris و همکاران [۱۹] و پس از آن، استخراج DNA به روش salting out، انجام گرفت. غلظت نمونه‌ها به کمک نانودراپ تعیین گردید.

آنالیز مولکولی پلی‌مورفیسم (Thr399Ile)، برای اولین بار با تکنیک PCRARMS Tetra انجام شد. در این تکنیک به‌منظور شناسایی هر پلی‌مورفیسم به چهار پرایمر نیاز می‌باشد که عبارت‌اند از یک جفت پرایمر خارجی Universal و یک جفت پرایمر داخلی[1] اختصاصی آلل[2] که در انتهای '3 دارای عدم تطابق[3] می‌باشد [۲۱، ۲۰] بنابراین هر فرد هموزیگوت ۲ باند و فرد هتروزیگوت ۳ باند را در ژل آگارز نشان خواهد داد وتعیین انواع ژنوتیپ محتمل برای نمونه تنها با یک واکنش PCR امکان‌پذیر است که این ویژگی موجب افزایش سرعت تشخیص و صرفه‌جویی در مصرف مواد می‌شود.

پرایمرهای به‌کار رفته برای موقعیت (Thr399Ile):

TGCAGGTGACACTTGTTCTCAAAGTGATTTTGG GACACC: Inner forward normal

GTCAGACTCACTATACCCATTGAAGCTCAGATC TAAATACTTTAGGCTTA: Inner Reverse mutant

:TGCAGGTGACACTACTTTCACTTCCAACAAAG

Outer forward

:GTCAGACTCACTATACCCATTTTCAAGACTTCG AGAC Outer reverse

[1] Inner primer
[2] allele specific
[3] Miss match

(نوکلئوتیدهای bold و ایتالیک عدم تطابق‌های اصلی و نوکلئوتیدهای دارای زیر خط، عدم تطابق‌های اضافه می‌باشند)

تعیین ژنوتیپ در موقعیت (Thr399Ile) با برنامه‌ی PCR در حجم ۲۰ ماکرولیتر و دارای سه مرحله، به شرح زیر انجام شد: ابتدا DNA ژنومیک به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C واسرشت گردید و سپس ۱۰ سیکل PCR انجام شد که هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه حرارت ۹۴°C برای دناتوراسیون، ۳۰ ثانیه حرارت ۵۷°C برای عمل ملحق شدن و ۱۸ ثانیه حرارت ۷۲°C برای تکثیر DNA بود. پس از آن ۱۵ سیکل دیگر انجام شد که هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه حرارت ۹۴°C برای دناتوراسیون، ۳۰ ثانیه حرارت ۵۰°C برای عمل ملحق شدن و ۳۰ ثانیه حرارت ۷۲°C برای تکثیر بود. و در نهایت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی در ۷۲°C قرار داده شد. طول قطعات تکثیرشده برای پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) براساس پرایمرهای طراحی شده به شرح زیر می‌باشد:

قطعه‌ی کنترل-bp365: قطعه‌ی نرمال-bp263: قطعه‌ی جهش یافته bp159:

محصول PCR روی ژل آگارز ۵٪ مشاهده شد. نمونه‌های هتروزیگوت ۳باند (طبیعی، جهش‌یافته وکنترل) و نمونه‌های هموزیگوت ۲باند (طبیعی یا جهش‌یافته به‌همراه باند کنترل) را نشان دادند (شکل ۱). در پایان، به‌منظور تایید صحت نتایج، برای تعدادی از نمونه‌ها تعیین توالی به‌صورت دو طرفه انجام گرفت.

روش‌های آماری: آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام گرفت. با استفاده از تست آماری نان پارامتریک Chi-Square برای مقایسه‌ی دو متغیر کیفی استفاده گردید.

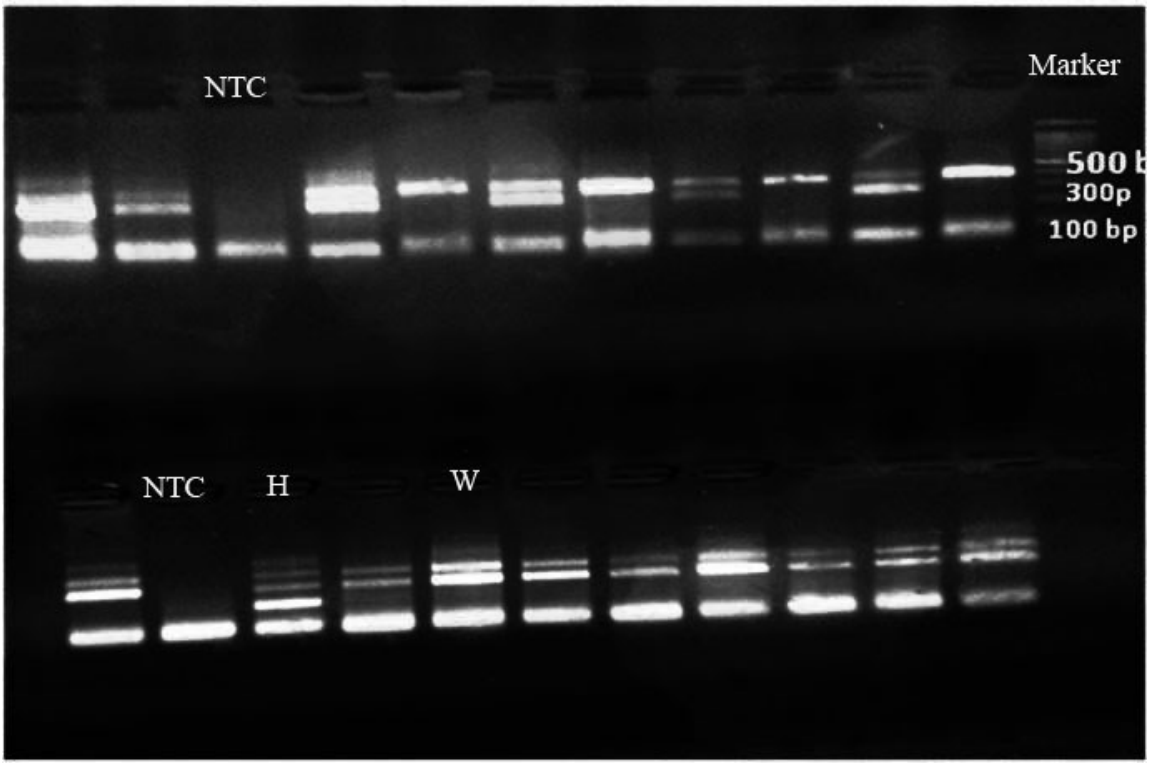
یافته‌ها

نتایج حاصل از مطالعه و فراوانی هر ژنوتیپ در جدول شماره‌ی [۱] بیان شده است. آنالیزهای آماری در دو گروه مورد و شاهد نشان دادند که تفاوت فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف موقعیت (Thr399Ile) (TT، CT،CC) به لحاظ آماری معنی‌دار هستند (P=0.021).

جدول ۱- توزیع شیوع ژنوتیپ‌پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) ژن TLR4 در دو گروه مورد و شاهد

		(Thr399Ile)		
		هتروزیگوت AT	جهش‌یافته TT	طبیعی CC
مورد	تعداد	۱۵	۰	۸۵
	درصد فراوانی	٪۱۵	٪۰	٪۸۵
	تعداد	۷	۰	۱۱۳
شاهد	درصد فراوانی	٪۵/۸	٪۰	٪۹۴/۱

P≤۰/۰۵: معنی‌دار



M: آلل جهش یافته (TT)، W: آلل طبیعی (CC)، H : هتروزیگوت (آلل TC)، NTC: کنترل منفی

شکل ۱- نتایج تعیین ژنوتایپ پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو توسط تکنیک تترا آرمز PCR بر روی ژل آگارز ۵٪

بحث

با توجه به اینکه آزمایشات مختلف اساس و پایه‌ی ژنتیک در دیابت را برای میزان حساسیت به انسولین و ترشح آن تایید کردند، نقش ژنتیک در دیابت نوع دو کاملاً پذیرفته شد است [۲۲، ۲۳]. شیوع دیابت نوع دو به‌طور گسترده‌ای در جمعیت‌های مختلف متغییر است. درست است که بخشی از این تفاوت‌ها به عوامل محیطی غیرژنتیکی و فاکتورهای فرهنگی نسبت داده شده‌اند، اما شیوع متفاوت بیماری در نژادهایی که شرایط محیطی مشابه دارند، نشانه‌ی بارز بر نقش فاکتورهای ژنتیک در استعداد ابتلا به دیابت هستند [۲۴].

از جمله ژن‌هایی که تا به حال ارتباط آن‌ها با دیابت نوع دو در قسمت‌های مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته‌اند می‌توان به CAPN10[1]، RBP4[2] و MMP9[3] اشاره کرد، که با توجه به نتایج تحقیقات این باور ایجاد گردیده که ژن‌های مستعد کننده‌ی دیابت نوع دو بر مسیرهای متفاوتی در شبکه‌های فیزیولوژیکی اثر خود را اعمال کرده‌اند و تأثیر متقابل آن‌ها نقص‌های متعدد کم اثر منفرد (اکثراً با OR کمتر از ۱/۴) در ترکیب با هم، اثر فیزیولوژیکی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد می‌کند [۲۶]. ژن TLR4 کد کنند پروتئین TLR4 می‌باشد که یک پروتئین پذیرنده و پیام‌رسان است و در فعال‌سازی پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی شرکت دارد [۹] و القاء کننده طیف گسترده‌ای از سایتوکاین‌ها می‌باشد و در رگزایی، ترمیم بافت و بازسازی نقش دارد. همچنین یک مولکول حیاتی در بهبود زخم می‌باشد [۲۵] به‌علاوه سایر مطالعات در گذشته نشان دادند که TLR4 یک فعالیت حیاتی در پاتوژنز IR و شرایط تجربی و بالینی دیابت نوع دو ایفا می‌کند و بالا دست فاکتورهای رشد مثل (EVGF) می‌باشد، با این تفاسیر TLR4 با نقش قابل توجه میتوژنی خود برای سلول‌های اپیتلیال و القاء کننده‌ی نفوذپذیری عروق به‌صورت بارز باعث بهبود زخم (رگ‌زایی و رسوب کلاژن) می‌گردد [۱۲].

با توجه به اینکه واریانت‌های ژنی که بیان و یا عملکرد TLR4 را تغییر می‌دهند، نیز بر استعداد ابتلا به دیابت نوع دو و مقاومت به انسولین مؤثر هستند، مطالعات فراوانی در زمینه‌ی نقش TLR4 در ایجاد دیابت و عوارض ماکروسکولار آن انجام شده است که بیشتر آن‌ها نقش معنی‌دار واریانت‌های TLR4 را در استعداد ابتلا به دیابت نوع دو و زخم پای دیابتی تأیید کرده‌اند ولی تاکنون نقش آن در ایجاد زخم پای دیابتی در ایران مورد بررسی قرار نگرفته است. و با توجه به اینکه بیماری دیابت و به‌دنبال آن ایجاد زخم پای دیابتی جز دسته بیماری‌های چند عاملی طبقه‌بندی می‌شوند بنابراین، فاکتورهای محیطی و ژنتیکی بسیاری در اتیولوژی و پاتوژنز بیماری دخالت دارند، شناسایی افراد در معرض خطر ابتلا به بیماری یکی از اهداف مهم حرفه‌ی پزشکی می‌باشد، لذا پیش‌بینی میزان خطر ابتلای افراد به بیماری از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. با توجه به مطالب ذکر شده و شواهد موجود به نظر می‌رسد ژن TLR4، یکی از ژن‌هایی است که در ایجاد استعداد ابتلا به زخم پا نقش مهمی داشته باشد. همان‌طور که ذکر گردید، بر روی این ژن در دنیا مطالعاتی صورت گرفته که در جمعیت‌های مختلف به‌دلیل متفاوت بودن زمینه‌های ژنتیکی و فاکتورهای محیطی نتایج متفاوتی به دست آمده است، برای مثال مطالعات بر روی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو در جمعیت ساکن در شمال هند یک ارتباط کاملاً واضح بین پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) از ژن TLR4 با زخم پای دیابتی نشان داده است. ما در این پژوهش برای اولین بار به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) با خطر ابتلای به زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو پرداختیم. نتایج نشان دادند که یک ارتباط معنادار بین پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) و افزایش خطر ابتلا به زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو وجود دارد ($P\leq ۰/۰۵$). پیشنهاد می‌شود، در مطالعات آینده فراوانی اللی پلی‌مورفیسم (Thr399Ile) در افراد غیردیابتی (سالم) کشورمان بررسی شده و با داده‌های حاصل از این مطالعه مقایسه گردد تا ارتباط آن‌ها با ابتلا به دیابت در جمعیت ایران نیز مشخص شود. به‌علاوه ارتباط این پلی‌مورفیسم با سکته‌ی قلبی، سکته‌ی مغزی، نوروپاتی، ABI[4] و BMI[5] به‌عنوان سایر فاکتورهای مؤثر در خطر ابتلا به زخم پای دیابتی، مشخص گردد.

[1] Calpain-10
[2] Retinol Binding Protein 4
[3] Matrix Metallopeptidase 9
[4] Ankle Biracial Index
[5] Body Mass Index

سپاسگزاری

اجرای این مطالعه با حمایت مالی پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. از تمام همکارانی که در این مرکز و کلینیک تخصصی دیابت و بیماری‌های متابولیک وابسته به پژوهشگاه مذکور، نهایت همکاری را مبذول داشتند و نیز از جناب آقای دکتر حمزه علیپور که آنالیزهای آماری طرح را انجام دادند قدردان و سپاسگزاریم.

مآخذ

1. Barnett A, Eff C, Leslie RD, and Pyke D, Diabetes in identical twins. *Diabetologia* 1981; 20: 87-93.
2. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, and Kronenberg HM. *Williams textbook of endocrinology*: Elsevier Health Sciences, 2015.
3. Mannucci E. Principles of Diabetes Mellitus. *JAMA* 2010; 304: 1615-1616.
4. Stumvoll M, Goldstein BJ , and Van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* 2005; 365: 1333-1346.
5. American Academy Of family phiysician 2009; Available at: www.aafp.org/afg/p789.html
6. Blüher M, BullenJr JW, Lee JH, Kralisch S, Fasshauer M, Klöting N, Niebauer J, Schön M. R, Williams CJ, and Mantzoros CS. Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 91: 2310-2316.
7. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, and Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996; vol. 86, pp. 973-983.
8. Vink A, Schoneveld AH, Van der Meer JJ, Van Middelaar BJ, Sluijter JP, Smeets MB, Quax PH, Lim SK, Borst C, and Pasterkamp G. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation.* 2002; 106: 1985-1990.
9. Grote K, Schütt H, and Schieffer B. Toll-like receptors in angiogenesis. *The Scientific World Journal* 2011; 11: 981-991.
10. Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, and Billiar TR. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock,* 2006; 26: 430-437.
11. Chen L, Guo S, Ranzer MJ, and DiPietro L. A. Toll-like receptor 4 has an essential role in early skin wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; 133: 258-267.
12. Asferg C, Jensen JS, Marott JL, Appleyard M, Møgelvang R, Jensen GB, and Jeppesen J. Markers of inflammation and hemodynamic measurements in obesity: Copenhagen City Heart Study. *American journal of hypertension* 2009; 22: 451-456.
13. Bulló M, Casas-Agustench P, Amigó-Correig P, Aranceta J, and Salvadó- Salas J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public health nutritio*, 2007;10:1164-1172.
14. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross J. S, and Tartaglia LA. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation,* 2003; 112: 1821-1830.
15. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, and Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research,* 2009;.153: 347-358.
16. Stojadinovic O, Kodra A, Golinko M, Tomic-Canic M, and Brem H. A novel, non-angiogenic, mechanism of VEGF: Stimulation of keratinocyte and fibroblast migration. in *Wound Repair and Regeneration*, 2007; A30-A30.
17. Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, Hanks CT, and Nör JE. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *Journal of endodontics,* 2006; 32: 951-955.
18. Kanhaiya AN and Gupta S. Differential expression of toll like receptor 4 in type 2 diabetic patients with impaired wound healing. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 2013; 4:4.
19. Harris R and Ukaejiofo E. Tissue Typing Using a Routine One-Step Lymphocyte Separation Procedure. *British journal of haematology,* 1970; 18:. 229-236.
20. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins A. R, and Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research,* 2001; 29:.e88-e88.
21. Collins A and Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. *The Open Bioinformatics Journal,* 2012;. 6: 55-58.
22. Cash JC and Glass CA. *Family practice guidelines*: Springer Publishing Company, 2010.
23. Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, Long J, Stern D, Tammana H, and Helt G. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 2005; 308:.1149-1154.
24. Costanzo F, Santoro C, Colantuoni V, Bensi G, Raugei G, Romano V, and Cortese R. Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for a human apoferritin H chain: evidence for a

multigene family. *The EMBO journal* 1984; 3: 23.

25. Macedo L, Pinhal-Enfield G, Alshits V, Elson G78, Cronstein BN, and Leibovich S. J. Wound healing is impaired in MyD88-deficient mice: a role for MyD88 in the regulation of wound healing by adenosine A2A receptors. *The American journal of pathology,* 2007;171: 1774-1788.

ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP BETWEEN (THR399ILE) POLYMORPHISM OF TLR4 GENE WITH DIABETIC FOOT ULCER IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS REFERRED TO THE CLINIC OF DIABETES & METABOLIC DISEASES

Sharare Hassanzade[1], Abbasali Raz[2], Masoumeh Mansouri[3], Zahra Mirzaeezadeh[4], Bagher Larijani[5], Mehrdad Hashemi[1], Kobra Omidfar[*4]

1. *Islamic Azad University, Tehran Medical Branch, Iran*
2. *Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
3. *Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
4. *Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular–Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
5. *Diabetes Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

ABSTRACT

Background: Type 2 diabetes is a metabolic disorder characterized by high blood sugar levels that can damage nerves. Many organs are affected ،especially the foot that leading to loss of sensation. These factors make favorable conditions for the development of diabetic foot ulcers. Polymorphisms (Thr399Ile) of Toll Like Receptor4 (TLR4) gene due to malfunction of TLR4 protein which plays an important role in immunity. The purpose of this study was to determine the parameters which are affecting the imbalance resulting in chronic inflammation and wound healing. By showing the relationship between single nucleotide polymorphism (Thr399Ile) of TLR4 gene with diabetic foot ulcer we can identify a biomarker for prediction of diabetic foot ulcer.
Methods: This is a case-control study. Single nucleotide polymorphisms of TLR4 gene were genotyped by hit Tetra ARMS PCR technique. In this study, 100 and 120 diabetic patients with and without foot ulcer were selected as the cases and controls, respectively.
Results: The Chi-square test revealed significant difference in frequency of TT, CC and TC alleles of (Thr399Ile) between case and control groups (P=0.021).
Conclusion: According to this study, there is a relationship between single nucleotide polymorphisms (Thr399Ile) of TLR4 gene with diabetic foot ulcer in type 2 diabetes patients.

Keywords: rbp4, Polymorphism, Diabetic foot ulcer

* Floor 5th, Shariati Hospital, North Karegar St., Tehran, Iran, Postal Code: 1411413137, Tel: +98(21)88220037, Fax: +98(21)88220052, Email: omidfar@tums.ac.ir