مجله دیابت و متابولیسم ایران. مهر- آبان ۱۳۹۶؛ دوره ۱۷ (شماره ۱) ۵۶-۴۹

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط واریانت 1562C>T- ناحیه‌ی پروموتر ژن MMP-9 با زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه کننده به کلینیک تخصصی و فوق تخصصی دیابت و بیماری‌های متابولیک تهران

سحر شفیعی[۱]، عباسعلی راز[۲]، ندا ادیبی[۲]، معصومه منصوری[۳]، زهره عنابستانی[٤]، زهرا میرزایی زاده[۵]، مهرداد هاشمی[۱]، کبری امیدفر[۵و۱*]

چکیده

مقدمه: دیابت نوع دو شایع‌ترین نوع دیابت و یک اختلال متابولیک و درون‌ریز پیچیده است که از جمله عوارض اصلی آن زخم پای دیابتی می‌باشد. ماتریکس متالوپروتئینازها از جمله آنزیم‌های کلیدی در بازسازی ماتریکس خارج سلولی‌اند و دارای فعالیت پروتئولیتیکی هستند. هدف ما از پژوهش حاضر بررسی ارتباط واریانت 1562C>T- (rs3918242) پروموتر ژن MMP-9 با زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو است تا در صورت تأیید همبستگی، از آن به‌عنوان مارکر زیستی پیش‌آگهی دهنده در بیماران با خطر بالای ابتلا استفاده شود.

روش‌ها: این مطالعه از نوع مورد–شاهد است. پلی‌مورفیسم 1562C>T- پروموتر ژن MMP-9 در ۱۰۰ بیمار دیابتی دارای زخم پا با درجه‌ی ۱ یا ۲ طبق طبقه‌بندی وگنر در گروه مورد و ۱۳۲ 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 معنادار را در فراوانی ژنوتیپ‌های (CC)، (CT) و(TT) متعلق به پلی‌مورفیسم 1562C>T- در پروموتر ژن MMP-9 نشان داد. (P=0.000).

نتیجه گیری: طبق این مطالعه ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم 1562C>T- در پروموتر ژن MMP-9 و خطر ابتلا به زخم پای دیابتی در بین افراد مبتلا به دیابت نوع دو وجود دارد. بنابراین می‌توان این بیومارکر را برای بررسی میزان و پیش‌آگهی خطر ابتلا به زخم پای دیابتی معرفی کرد.

واژگان کلیدی: دیابت نوع دو، زخم پای دیابتی، ماتریکس متالوپروتئیناز-۹(MMP-9)، بیومارکر، پلی مورفیسم 1562C>T-

۱- گروه ژنتیک، 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

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

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

*نشانی: خیابان کارگر شمالی، خیابان جلال آل احمد، بیمارستان شریعتی، طبقه‌ی پنجم، مرکز غدد درون‌ریز و متابولیسم، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۵ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۶/۸/۱۷** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۸**

مقدمه

دیابت از جمله بیماری‌های شایع و ناتوان کننده‌ی غیرواگیر در انسان است که می‌تواند مشکلات جدی را برای اندام‌ها ایجاد کند و در صورت عدم درمان مناسب خسارت‌های جانی و مالی فراوانی را به فرد بیمار و اجتماع تحمیل می‌کند. دیابت یک اختلال در متابولیسم بدن است که فرد در طی دوره‌ای طولانی مدت به‌دلیل کاهش توانایی بدن در سوخت و ساز کامل قند، سطح قند خون بالایی پیدا کرده و اگر بدون درمان رها شود به عوارض متعددی از جمله سکته‌ی مغزی، بیماری‌های قلبی و عروقی، نارسایی کلیه، آسیب چشم‌ها و زخم در پا دچار می‌شود [۱]. دیابت نوع دو از بیماری‌های چندعاملی بوده و واکنش‌های ژن – ژن یا ژن – محیط در ایجاد بیماری و عوارض آن نقش دارند. میزان نفوذ دیابت نوع دو بین ۱۰ تا ۴۰٪ در بستگان متغیر است. در این بیماران هماهنگی حدود ۹۰٪ در دوقلوهای تک تخمکی MZ، نشان دهنده‌ی نقش بیشتر ژنتیک در این بیماری در مقایسه با نوع یک می‌باشد [۲]. ژن‌های بسیاری در ارتباط با دیابت نوع دو شناسایی شده‌اند که از جمله آنها می‌توان به CAP10، NHF4α، MMP-9، TLR4، RBP4، ادیپونکتین‌ها و مارکری به نام D2S725 اشاره کرد [۷–۳]. خطر بروز دیابت نوع دو خیلی بیشتر از نوع یک است و برای بستگان درجه‌ی یک بیمار به میزان ۱۵٪ در نظر گرفته می‌شود. درحالی که وقتی هر دو والد مبتلا باشند، میزان خطر برای فرزندان ۷۰ – ۶۰ درصد خواهد بود [۸]. پای دیابتی و زخم پای دیابتی یکی از عوامل بزرگ ناتوانی در بیماران دیابتی به حساب می‌آید و علی‌رغم پیشرفت‌های زیادی که در زمینه‌ی تشخیص و درمان دیابت انجام گرفته، هنوز هم معضل پای دیابتی رفع نشده است. طبق تعریف سازمان جهانی بهداشت، پای دیابتی در واقع عفونت، زخم و یا تخریب بافت‌های نرم عمیق است که در ارتباط با ناهنجاری‌های نورولوژیکی و درجات متفاوتی از ناهنجاری‌های عروق محیطی در اندام‌های تحتانی به‌وجود می‌آید [۱۰، ۹]. خطر ابتلا به زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت در حدود ۱۵٪ می‌باشد و ۸۵٪ از تمام موارد قطع عضو تحتانی وابسته به دیابت، دارای زخم پا می‌باشند [۱۲، ۱۱]. گرچه پیشرفت‌های زیادی در زمینه‌ی درمان زخم پا حاصل شده است اما اکثر این درمان‌ها دارای اثرات نسبی بوده و با یکدیگر مکمل هستند. به‌علاوه هزینه‌های سنگینی نیز به بیماران تحمیل می‌کنند. بنابراین مشخص نمودن افراد با خطر بالای ابتلا به زخم پای دیابتی حائز اهمیت است زیرا بدین ترتیب می‌توان عوارض ابتلا به بیماری را تا حد زیادی کاهش داد. یافتن مارکری زیستی جهت شناسایی بیماران تحت خطر، به‌منظور هشدار به افراد مستعد، تغییر در روش زندگی آنها، حذف فاکتورهای محیطی کمک کننده به ایجاد زخم و به‌طور کلی مدیریت بیماری، باعث به تأخیر افتادن بروز علائم بیماری و در صورت بروز آن، شدت علائم را کاهش می‌دهد [۱۳]. ماتریکس متالوپروتئیناز[1]ها، خانواده‌ای از آنزیم‌های دارای فعالیت پروتئولیتیکی هستند که در هضم اتصالات خارج سلولی شامل کلاژن‌ها، پروتئوگلیکان‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و بافت پایه‌ی نگه‌دارنده‌ی سلول‌ها، ایفای نقش می‌کنند [۱۵، ۱۴]. به‌طور کلی این آنزیم‌ها در مقادیر اندک بیان شده و عمل تنظیم آنها در سطح بیان، ترشح و فعالیت آن‌ها صورت می‌گیرد. در شرایط نوسازی بافت این ترکیبات به‌سرعت بیان می‌شوند. تولید و ترشح ماتریکس متالوپروتئینازها در اکثر سلول‌ها یک فرآیند دائمی بوده و لیکن در سلول‌های سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها به فرم ذخیره وجود داشته و تحت شرایط مختلف آزاد می‌گردند [۱۶]. فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها، به‌صورت خارج سلولی نیز تنظیم می‌گردد. ممانعت کننده‌های طبیعی ماتریکس متالوپروتئینازها نیز در کنترل فرآیند التهاب نقش به‌سزایی دارند [۱۸، ۱۷]. بدین‌ترتیب در شرایط فیزیولوژیک نظیر ترمیم زخم [۱۹] و پیری [۲۰]، تجزیه و فعال شدن ماتریکس متالوپروتئینازها تحت کنترل ممانعت کننده‌های آندروژن می‌باشد. لیکن در بسیاری از شرایط پاتولوژیک نظیر زخم پای دیابتی، آرتریت روماتوئید، استئوآرتریت، بیماری‌های قلبی و عروقی، اولسراسیون، آمفیزم، سرطان و متاستاز [۲۳–۲۱]، تجزیه‌ی بیش از حد ماتریکس خارج سلولی موجب تخریب بافت شده و واکنش‌های التهابی را تسریع می‌نماید [۲۶–۲۴]. یکی از MMPها که نقش و فعالیت آن در روند ترمیم زخم مورد بررسی قرارگرفته، MMP-9 است. آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز–۹ که به نام‌های دیگر ژلاتیناز B و کلاژناز نوع IV نیز شناخته می‌شود، قادر به تجزیه ماتریکس خارج سلولی، غشاءهای پایه و تنظیم چسبندگی سلولی می‌باشد. علاوه بر تخریب غشای پایه، این آنزیم از طریق برهم‌کنش‌های پیچیده سلول – سلول و سلول – ماتریکس، بر محیط سلولی اثر می‌گذارد [۲۸، ۲۷]. این آنزیم به‌طور مستقیم از طریق پروتئین‌های اتصالی به‌عوامل رشد

[1] Matrix metalloproteinase

نظیر TGF-B[1] ، IGF 1[2]، TNF-α[3] ، MB-EGF[4]متصل شده و مانع اتصال این عوامل به گیرنده‌های خود می‌گردد [۳۰، ۲۹]. ژن آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ در موقعیت 20q12.2-13.1 قرارگرفته [۳۱] و افزایش بیان آن تحت عنوان کلاژناز ۹۲ کیلو دالتونی، در زخم پای دیابتی دیده شده است [۳۲]. پروموتر MMP-9 در یک منطقه‌ی ۲/۲ کیلوبازی مجاور انتهای ژن قرارگرفته [۳۳] و دارای جایگاه اتصال عوامل نسخه‌برداری شامل SP1[5] ، AP1[6]، ATAT[7]، NF-K[8]، RAR / RXR[9] و TCF / LEF[10] می‌باشد [۳٤]. پروتئین حاصل از این ژن به‌دلیل دارا بودن فعالیت کلاژنازی در حالت افزایش بیان، باعث از هم‌گسیختگی غشای پایه می‌گردد و به همین دلیل نقش مهمی در زخم پای دیابتی ایفا می‌کند [۳۵]. بنابراین ما فرض می‌کنیم میزان بیان زیاد MMP-9 ممکن است باعث عدم بهبود زخم در اندام‌های تحتانی افراد مبتلا به دیابت نوع دو گردد. هدف پروژه‌ی حاضر بررسی جهش rs3018242 ژن MMP-9 و ارتباط آن با زخم پای دیابتی و محاسبه‌ی میزان خطر ابتلا در صورت تأیید همبستگی می‌باشد. براساس مطالعات انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای بر روی ارتباط واریانت ژنتیکی این ژن با زخم پای دیابتی در ایران انجام نشده و این برای اولین بار است که از تکنیک Tetra-ARMS PCR برای بررسی این جهش مورد استفاده قرار گرفته است.

روش‌ها

این پژوهش به روش مورد-شاهد انجام شده و با توجه به معیارهای ورود به مطالعه، تعداد ۲۳۲ بیمار، شامل ۱۰۰ نفر در گروه مورد و ۱۳۲ نفر در گروه شاهد، تحت نظر پزشک از بین بیماران دیابتی مراجعه کننده به کلینیک تخصصی دیابت و بیماری‌های متابولیک تهران، انتخاب شدند. گروه مورد، شامل بیماران دیابتی با زخم پای دیابتی درجه‌ی ۱ یا ۲ مطابق با طبقه‌بندی وگنر وگروه شاهد، بیماران دیابتی بدون زخم پا و یا سابقه‌ی ابتلا به زخم پای دیابتی بودند. معیارهای ورود به مطالعه براساس طبقه‌بندی وگنر عبارت بودند از ابتلا به دیابت نوع دو، سن بالای ٤٠ سال، زخم پا با درجه‌ی ۱ یا ۲ و معیارهای خروج از مطالعه براساس طبقه‌بندی وگنر زخم پا با درجه‌ی ۳ یا ٤، مصرف مکمل‌های ویتامینی (ویتامین B۱۲ و اسید فولیک)، کراتین بالای ۲mg/dl، سیروز کبدی، sever retinopathy، نارسایی قلبی کلاس ۳ یا ٤ (براساس NYHR) و وجود سایر بیماری‌هایی که منجر به نوروپاتی به غیر از دیابت می‌شود، بودند. 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 ومتابولیسم مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها:

ابتدا استخراج لنفوسیت براساس روش Harris و همکاران [۲۲] و پس از آن، استخراج DNA به روش salting out، انجام گرفت. در مرحله‌ی بعد، غلظت نمونه‌ها به کمک نانودراپ تعیین گردید.

آنالیز مولکولی پلی‌مورفیسم rs3918242 برای اولین بار با روش PCR ARMS Tetra که تکنیکی دقیق، سریع و اقتصادی جهت شناسایی جهش‌های تک نوکلئوتیدی است، انجام شد. در این تکنیک به‌منظور شناسایی هر پلی‌مورفیسم به چهار پرایمر نیاز می‌باشد که عبارتند از یک جفت پرایمر خارجی[11] Universal و یک جفت پرایمر داخلی[12]ا ختصاصی آلل[13] که در انتهای' ۳ دارای عدم تطابق[14] می‌باشد [۳٦، ۳۷]. بنابراین در این تکنیک برای فرد هموزیگوت ۲ باند و برای فرد هتروزیگوت ۳ باند در ژل آگارز مشاهده خواهد شد. با توجه به طراحی هوشمندانه انجام شده، برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه تنها به یک واکنش PCR نیاز می‌باشد (برخلاف تکنیک ARMS PCR که به دو واکنش PCR نیاز می‌باشد) که این ویژگی، موجب افزایش سرعت تشخیص و صرفه‌جویی در مصرف مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR می‌گردد.

[1] Transforming Growth Factor-β
[2] Insulin-Like Growth factor 1
[3] Tumor Necrosis Factor-α
[4] Heparin –Binding EGF-Like Growth Factor
[5] Specificity Protein 1
[6] Activator Protein 1
[7] Single Transducers and Activators of Transcription
[8] Nuclear Factor-Kappa B
[9] Retinoic Acid Receptor / Retinoid X Receptor
[10] Transcription Factors / Lymphoid Enhancer Factor
[11] Outer primer
[12] Inner primer
[13] allele specific
[14] Miss match

پرایمرهای به‌کار رفته برای تعیین ژنوتیپ موقعیت rs3918242:

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای rs3918242

Primer	Sequence
Inner mutant	ATCTCACAGTCTCAATTTATTAGATAAGC***C<u>T</u>***
Inner wild	CTACTATGTGCCAGGCATTTTA**<u>G</u>G**
Outer wild	AGCTGGTATTATAGGCGTG
Outer mutant	AAGCAGTGTTCATTGGTTGGTTAG

نوکلئوتیدهای bold و ایتالیک، نوکلئوتیدهای اختصاصی آلل و نوکلئوتیدهای دارای زیر خط، عدم تطابق های اضافه می‌باشند

تعیین ژنوتیپ در موقعیت rs3918242 با برنامه PCR در حجم ۳۰ ماکرولیتر و دارای سه مرحله، به شرح زیر انجام شد:

جدول ۲- مقادیر فاکتورهای واکنش PCR برای rs3918242

Material	Concentration	Amount(µl)
Master mix	2.5X	8
Wild Inner primer	10 p	0.8
Mutant Inner primer	10 p	0.8
Wild Outer primer	10 p	0.2
Mutant Outer primer	10 p	0.3
Taq DNA polymerase	500 unt	0.2
Template	(ng/µl)	Variant
Deionize water		Variant
Total volume		20
PCR Oil		10

طول قطعات تکثیرشده برای پلی‌مورفیسم مورد نظر براساس پرایمرهای طراحی شده به شرح زیر می‌باشد:

قطعه کنترل: bp ۳۲۰- قطعه نرمال: bp ۲۵۱-

قطعه‌ی جهش یافته: bp ۱۲٤

محصول PCR روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده گردید. نمونه‌های هتروزیگوت، ۳ باند (طبیعی، جهش‌یافته و کنترل) و در نمونه‌های هموزیگوت ۲ باند (طبیعی یا جهش‌یافته به‌مراه باند کنترل) مشاهده گردید (شکل۱). در پایان، به‌منظور تأیید صحت نتایج، تعدادی از نمونه‌ها به‌صورت تصادفی انتخاب و تعیین توالی[1] به‌صورت دو طرفه انجام شد.

روش‌های آماری: آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۱٦ انجام گرفت. با استفاده از تست آماری غیرپارامتریکِ Chi-Square، برای مقایسه‌ی دو متغیر کیفی استفاده گردید.

یافته‌ها

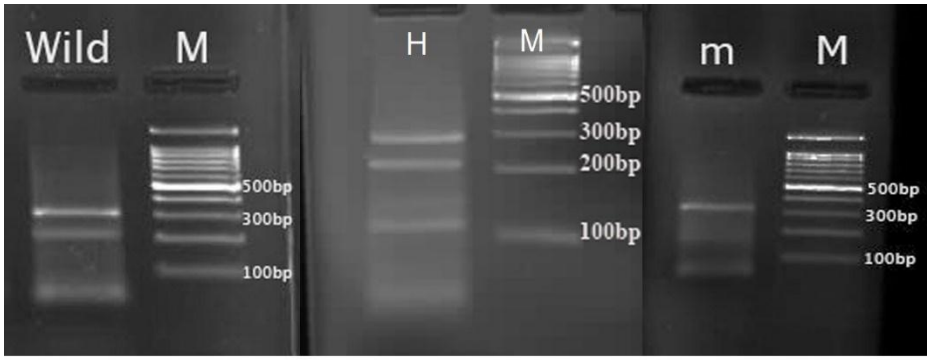
نتایج حاصل از مطالعه و فراوانی هر ژنوتیپ در جدول شماره ۳ ارائه شده است. آنالیزهای آماری در دو گروه مورد و شاهد نشان داد که تفاوت فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف موقعیت rs3918242 (TT، CT، CC) به لحاظ آماری معنی‌دار هستند. (P=0.000).

[1] Direct sequencing

جدول ۳- توزیع شیوع ژنوتیپ پلی‌مورفیسم 1562C>T-در پروموتر ژن MMP-9 (rs3918242) در دو گروه مورد و شاهد

		Rs3918242		
		هتروزیگوت CT	جهش‌یافته TT	طبیعی CC
مورد	تعداد	۳۲	۵۷	۱۱
	درصد فراوانی	٪۳۲	٪۵۷	٪۱۱
شاهد	تعداد	۱۲٤	۰	۸
	درصد فراوانی	٪۹۳/۹٤	٪۰	٪۰/۰٦

P≤۰/۰۵: معنادار



شکل ۱- نتایج تعیین ژنوتایپ موقعیت rs3918242 در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو توسط تکنیک تترا آرمز PCR برروی ژل آگارز ۲٪

M: مارکر، m: آلل جهش یافته (TT)،W: آلل طبیعی (CC)،H: هتروزیگوت (آلل CT)

بحث

یکی از شایع‌ترین، جدی‌ترین و پرهزینه‌ترین عوارض مربوط به بیماری دیابت نوع دو، زخم پای دیابتی است که خطر مرگ را در بیماران دیابتی، ٤-۲ برابر افزایش می‌دهد [۳۸]. علت اصلی ایجاد زخم‌های پای دیابتی خشک و شکننده شدن پوست بدن و بالا رفتن احتمال ترک برداشتن آن به‌دلیل ایجاد نوروپاتی و همچنین فقدان حس درد در اندام مبتلا به نوروپاتی است [۳۹].

از جمله ژن‌هایی که تا به حال ارتباط آنها با دیابت نوع دو در مناطق مختلف دنیا بررسی شده است. می‌توان به MMP9، RBP4، STRA6، CAPN10، TLR4 و فاکتور XIII اشاره کرد که این نشان دهنده‌ی این نکته است که ژن‌های مستعد کننده‌ی ابتلا به T2DM بر مسیرهای متفاوتی در شبکه‌های فیزیولوژیکی تأثیر گذار بوده‌اند و تأثیر متقابل آن‌ها در ترکیب باهم اثر فیزیولوژیکی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد می‌کند. پروتئین حاصل از ژن MMP9 آنزیمی از خانواده‌ی بزرگ ماتریکس متالوپروتئینازها است که در تجزیه‌ی اتصالات بین غشای پایه‌ی سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی ایفای نقش می‌کند [٤۰]. افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های متالوپروتئیناز در فرآیندهای پاتوژنز (بیماری‌زای) متعددی شناسایی شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به التهاب عمومی[1]، متاستاز تومور[2]، بیماری‌های تنفسی[3]، آسیب میوکارد[4]، آنورسیم عروقی[5]، بازآرایی عروق[6] و رده‌های سلولی سرطانی[7] اشاره کرد [٤۱]. ژلاتیناز B یا کلاژناز IV (MMP9)، یکی از مهم‌ترین اعضای

[1] General inflammation
[2] Metastasis
[3] respiratory diseases
[4] Myocardial injury
[5] Artery aneurysm
[6] Vascular remodeling
[7] Cancer cell lines

این خانواده می‌باشد که بر اتصالات بین سلولی شامل انواع مختلف کلاژن‌ها، الاستین و پروتئوگلایسین‌ها اثر می‌گذارد [۴۲، ۴۳]. این پروتئین به‌دلیل دارا بودن فعالیت کلاژنازی در حالت افزایش بیان، باعث از هم‌گسیختگی غشای پایه می‌گردد [۳۵] و به‌همین دلیل نقش مهمی در زخم پای دیابتی ایفا می‌کند. سطح پروتئینازها نه تنها عملکرد سلول‌های زخم را وخیم می‌کند بلکه یک عدم تعادل در پروتئازها و فاکتورهای رشد در محل زخم تحمیل می‌کند. Yager و همکاران [۴۴] و Chen و همکاران [۴۵] به وضوح نشان دادند که سطح پروتئازها در محل زخم منجر به یک فرآیند بهبود زخم نامنظم و مختل شده به‌وسیله پروتئین‌های تجزیه کننده ماتریکس و فاکتورهای رشد که برای بهبود ضروری هستند شده است. غلظت مناسب MMP2 و MMP9 برای حذف کلاژن دناتوره شده فیبریلار و برای رشد مناسب بافت گرانوله مورد نیاز است. Liu و همکاران نشان دادند که غلظت بالایی از MMP9 و نسبت بالای MMP9 به TIMP-1 در زخم‌های دیابتی در بیماران مبتلا به DFU، باعث ضعف در بهبود زخم می‌شود [۴۶]. Mclennan و همکاران نشان دادند که مایع زخم از مدل دیابتی "baboon" شامل افزایش مقدار زیادی از فرم بیولوژیک فعال از MMP9 است که منجر به نوعی زخم التهابی دائمی در آن‌ها می‌شود [۴۷]. میزان بیان MMP9 و در نتیجه میزان مشارکت آن در هضم اتصالات بین سلولی و پیشروی زخم پای دیابتی، می‌تواند تحت تأثیر وجود یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی از نوع جابجایی باز T C→ در ناحیه‌ی ۱۵۶۲ – پروموتر ژن MMP9 که یک ناحیه‌ی تنظیمی مهم است باشد. این پلی‌مورفیسم رونویسی را تحت تأثیر قرار داده و منجر به فعالیت زیاد پروموترهایی می‌شود که حامل آلل T هستند. در نتیجه پروموترهایی با ژنوتایپ (C/C) فعالیت کم داشته و نرمال هستند و پروموترهایی با ژنوتایپ (C/T) در حالت هتروزیگوت بوده و فعالیتی کمی بیشتر از نرمال دارند و پروموترهایی با ژنوتایپ (T/T) دارای فعالیت زیاد هستند. همچنین، تکنیک Report Assay نشان داده است که آلل T-1562 نسبت به C-1562 دارای فعالیت بالاتر پروموتر در کنترل بیان ژن است [۳۲]. همچنین Blankenberg و همکاران نشان دادند که سطح پلاسمایی mmp-9 در بیماران باآلل T-1562 نسبت به افراد غیر حامل بالاتر است [۴۸]. در پژوهشی مشابه با پژوهش حاضر، Singh و همکاران مطالعاتی روی همراهی پلی‌مورفیسم مورد نظر با دیابت نوع دو و DFU در سال ۲۰۱۳ در جمعیت هند انجام دادند [۳۲]. این مطالعات با کمک تکنیک‌های PCR-RFLP و توالی‌یابی انجام شده و نتیجه‌ی حاصل از آن یک همراهی قوی بین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی C>T -1562 در پروموتر ژن MMP9 و زخم پای دیابتیک را در جمعیت هند نشان داد. در این مطالعه نیز، مانند مطالعه‌ی ما توزیع آلل به‌طور قابل توجهی بین گروه‌های مورد و شاهد متفاوت است (P=0.00048)، بنابراین نتایج حاصل به تأیید این همراهی بیشتر کمک می‌کند. در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار با تکنیک Tetra-ARMS PCR به تعیین فراوانی آلی پلی‌مورفیسم rs3918242 در در پروموترژن MMP9 در افراد دارای زخم پای دیابتی پرداختیم تا ضمن تعیین فراوانی آللی این پلی‌مورفیسم در جمعیت ایران، در صورت تأیید همبستگی، از آن به‌عنوان یک بیومارکر در تشخیص زخم پای دیابتی استفاده شود. ما در این پژوهش برای اولین بار در کشورمان ارتباط rs3918242 که در منطقه‌ی تنظیمی ژن واقع شده‌است، با خطر ابتلای به زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بررسی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم مورد مطالعه و افزایش خطر ابتلا به زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو وجود دارد (P≥ ۰/۰۵).

پیشنهاد می‌شود، در مطالعات آینده فراوانی آللی پلی‌مورفیسم rs3918242 در افراد غیردیابتی (سالم) کشورمان نیز بررسی شده و با داده‌های حاصل از این مطالعه مقایسه گردد تا ارتباط آنها با ابتلا به دیابت در جمعیت ایران نیز مشخص گردد. به‌علاوه ارتباط این پلی‌مورفیسم با سکته‌ی قلبی، سکته‌ی مغزی، رتینوپاتی، نوروپاتی، ABI[1] و BMI[2] به‌عنوان سایر فاکتورهای مؤثر در خطر ابتلا به زخم پای دیابتی ارزیابی شود.

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

[1] Ankle Biracial Index
[2] Body Mass Index

بیماری‌های متابولیک تهران نهایت همکاری را مبذول داشتند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

مآخذ

1. Mellitus D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2005; 28:S37.
2. Patti ME. Gene expression in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Current diabetes reports* 2004; 4(3):176-181.
3. Dinh T, et al. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes* 2012; 61(11):2937-2947.
4. Hanis C, et al. A genome–wide search for human non–insulin–dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature genetics* 1996; 13(2):161-166.
5. Lehto M. et al. Mutation in the HNF-4 gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes-New York* 1999; 48:423-425.
6. Singh K, et al. *Association of Toll-like receptor 4 polymorphisms with diabetic foot ulcers and application of artificial neural network in DFU risk assessment in type 2 diabetes patients. BioMed research international* 201; 2013.
7. Takebayashi K, et al. Retinol binding protein-4 levels and clinical features of type 2 diabetes patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92(7):2712-2719.
8. Hagay Z. and EA. Reece, Diabetes mellitus in pregnancy and periconceptional genetic counseling. *American Journal of Perinatology* 1992; 9(2): p. 87-93.
9. Aalaa M, et al. Nurses' role in diabetic foot prevention and care; a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2012; 11(1):1.
10. Sueki H, et al. Association of verrucous skin lesions and skin ulcers on the feet in patients with diabetic neuropathy. *Clinical and experimental dermatology* 2004; 29(3):247-253.
11. Brem H, and M. Tomic-Canic, Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(5):219.
12. Frykberg RG. Diabetic foot ulcers: pathogenesis and management. *American family physician* 2002; 66(9):1655-1662.
13. Melmed S, et al. *Williams textbook of endocrinology*. 2015: Elsevier Health Sciences.
14. Massova I, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *The FASEB Journal* 1998; 12(12):1075-1095.
15. Nagase H, Barrett A, and Woessner Jr, Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix* (*Stuttgart, Germany). Supplement*, 1991; 1:421-424.
16. Lovejoy B, et al. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* 1994; 263(5145):375-377.
17. Edwards D, et al. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity* 1996; 20:S9-15.
18. Gomez D, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of cell Biology* 1997; 74(2):111-122.
19. Wang M. Role of MMPs & their inhibitors in cutaneous wound healing & contact hypersensitivity. *Ann NY Acad Sci* 1999; 878:12-14.
20. Khorramizadeh M, et al. Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Molecular and cellular biochemistry* 1999; 194(1-2): 99-108.
21. Fidler IJ, Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. *Cancer: Principles and practice of oncology* 1997; 1:135-152.
22. Singh K, et al. Differential Expression of Matrix Metalloproteinase-9 Gene in Wounds of Type 2 Diabetes Mellitus Cases With Susceptible-1562C> T Genotypes and Wound Severity. *The international journal of lower extremity wounds*, 2014; p. 1534734614534980.
23. Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, and Corcoran M. *Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. in Seminars in cancer biology*. 1996; Elsevier.
24. Drummond AH, et al. Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; 878(1): 228-235.
25. Jones L, et al. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; 880(1):288-307.
26. Shalinsky D, et al. Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; 878(1):236-270.
27. Heist RS, et al. Matrix metalloproteinase polymorphisms and survival in stage I non–small cell lung cancer. *Clinical cancer research* 2006; 12(18):5448-5453.
28. McGowan SE. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *The FASEB Journal* 1992; 6(11):2895-2904.
29. Schultz GS, and Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound repair and regeneration* 2009; 17(2):153-162.
30. Somerville R, Oblander SA, and Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003; 4(6):216.
31. Wang Y, et al. No association between the C-1562T polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase-9 gene and non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 2005; 49(2):155-161.
32. Singh K, et al. A Functional Single Nucleotide Polymorphism-1562C> T in the Matrix Metalloproteinase-9 Promoter Is Associated With Type 2 Diabetes and Diabetic Foot Ulcers. *The*

international journal of lower extremity wounds, 2013: p. 1534734613493289.
33. Atkinson JJ, and Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2003; 28(1):12-24.
34. Woessner JF, NH, ed. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. ed. n. ed. 2000, UK: Oxford University Press: Oxford.
35. Ozalp S, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase-B) expression in epithelial ovarian tumors. *European journal of gynaecological oncology* 2002; 24(5):417-420.
36. Collins A, and X. Ke. Primer1: primer design web service for tetra-primer *ARMS-PCR. The Open Bioinformatics Journal* 2012; 6:55-58.
37. Ye S, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research* 2001; 29(17):e88-e88.
38. Yekta Z, Pourali R, and Ghasemi-Rad M. Comparison of demographic and clinical characteristics influencing health-related quality of life in patients with diabetic foot ulcers and those without foot ulcers. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2011; 4: 393-399.
39. Kashefi A. and Haddadnia J. Provide an automated method for quantitative comparison of peer to peer at the feet of diabetic foot ulcers in order to predict the thermal images and computer vision techniques. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2015; 14(5):325-336.
40. Forget MA. Desrosiers RR, and Béliveau R. *P*hysiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. Canadian *Journal of physiology and pharmacology* 1999; 77(7):465-480.
41. Galis ZS, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 94(6):2493.
42. Egeblad M, and Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Reviews *Cancer* 2002; 2(3):161-174.
43. Przybylowska K, et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2006; 95(1):65-72.
44. Yager DR, et al. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *Journal of Investigative Dermatology* 1997; 107(5):743-748.
45. Chen, C, et al. Molecular and mechanistic validation of delayed healing rat wounds as a model for human chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 1999; 7(6):486-494.
46. Liu Y, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes care* 2009; 32(1):117-119.
47. McLennan S, Min D, and Yue D. Matrix metalloproteinases and their roles in poor wound healing in diabetes. Wound Practice & Research: *Journal of the Australian Wound Management Association* 2008; 16(3):116.
48. Blankenberg S, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*; 2003; 107(12):1579-1585.

ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP BETWEEN -1562C>T ALLELE OF MMP9 GENE PROMOTER WITH DIABETIC FOOT ULCER IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS REFERRED TO THE CLINIC OF DIABETES & METABOLIC DISEASES

Sahar Shafiee[*1], Abbasali Raz[2], Neda Adibi[2], Masoomeh Mansouri[3], Zohreh Annabestani[4], Zahra Mirzaeezadehe[5], Mehrdad Hashemi[1], Kobra Omidfar[51]

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. *Diabetes Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
5. *Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular–Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

ABSTRACT

Background: Type 2 diabetes is the most common type of diabetes, and a complex endocrine metabolic disorder that one of its main complications is diabetic foot ulcers. Matrix metalloproteinases (MMPs) are one of the key enzymes in the reconstruction of extracellular matrix which have proteolytic activity. The aim of this research is based on evaluating relationship between -1562 C>T allele at MMP-9 gene promoter with diabetic foot ulcer in type II diabetic patients. If such correlation proves, it can be used as a prognostic biomarker in patients with high-risk.

Methods: This is a case-control study. The single nucleotide polymorphism of -1562C>T allele of MMP9 gene promoter was genotyped by hit Tetra ARMS PCR technique in 100 diabetic patients with foot ulcer grade 1 or 2 as the case group according Wagner classification and in 100 diabetic patients without foot ulcer as the control group. **Results:** The Chi-square test revealed significant difference in genotype frequency of CC, CT and TT alleles of -1562C>T allele of MMP9 gene promoter between case and control groups (P=0.000).

Conclusion: According to this study, there is a relationship between -1562C>T allele of MMP9 gene promoter with diabetic foot ulcer in type2 diabetes patients. Thus we can introduce this biomarker for evaluation of risk and prognosis of diabetic foot ulcers.

Keywords: Type 2 Diabetes, Diabetic Foot Ulcer, Matrix Matalloproteins-9 (MMP-9), Biomarker, Polymorphism -1562 C>T

[*] Shariati Hospital (5th floor), North Kargar Avenue, Endocrinology and Metabolism Research Institute, Tehran, Iran, 1411413137, Phone: +98-21-88220037, Email:omidfar@tums.ac.ir