مجله دیابت و لیپید ایران. تابستان ۱۳۸۴؛ دوره ۴ (شماره ۴): ۱۹-۱۱

ژنتیک نفروپاتی دیابتی: بررسی نقش ژن TGF-β1

جواد توکّلی بزّاز*[۱]، ورا پراویکا[۲]، آندره بولتون[۳]، یان هاچینسون[۲]

چکیده

مقدمه: نفروپاتی دیابتی هنوز هم یکی از شایع‌ترین علل نارسایی پیشرفته کلیوی محسوب می گردد. یکی از موانع موجود در پیشگیری مؤثرتر از این عارضه، ماهیّت پیچیده و نقش سیّالی است که زمینه ژنتیکی افراد دیابتی در زمینه هدایت و هماهنگی(Orchestrating) میان علل شناخته و ناشناخته این عوارض در قالب استعداد و یا مقاومت میزبان از خود نشان می دهند.

بررسی تأثیرات منفرد هر ژن با اولویت ژن هایی که دخالت آنها در ایجاد و یا پیشرفت فنوتیپ مورد مطالعه، توجیه بیولوژیک دارد، تنها رویکرد مطالعاتی است که برای غلبه بر پیچیدگی (Complexity) و تجزیه (Dissection) زیرساخت ژنتیکی بیماریهای کمپلکس (مثل نفروپاتی دیابتی) ، در دسترس محققین قرار دارد.

روش‌ها: در قالب یک "Association Study"، تأثیرات و قابلیت‌های فنوتیپیک پلی‌مورفیسم‌های ژن TGF-β1 در کدون های ۱۰ (+۸۶۹*T/C) و (+۹۱۵*G/C) ۲۵ در پیدایش و کنترل شدّت نفروپاتی دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک (T1DM) مورد مطالعه قرار گرفت. میزان فراوانی آلل/ ژنوتیپ حاصله از پلی‌مورفیسم‌های ژن مذکور که توسط روش PCR – ARMS تایپ گردید، در دو گروه بیمار (۲۴۸ نفر: DN^{+} 86 و DN^{-} 162) و کنترل سالم (۱۱۳ نفر) که همگی "بریتانیایی- قفقازی" بوده‌اند، بررسی گردید.

یافته‌ها: تفاوت معناداری در توزیع فراوانی آلل‌های پلی‌مورفیک ژن TGF-β1 بین گروه‌ها و زیرگروه‌های افراد مورد مطالعه مشاهده نشد(P=NS).

نتیجه‌گیری: این عدم تفاوت در توزیع آلل‌ها/ ژنوتیپ‌ها، می‌تواند تا حدودی "قابلیت عملکردی" (Functionality) (و البته پتانسیل پروگنوستیک) پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه را در سطح ژنی به عنوان نشانگرهایی "قابل اعتماد"، زیر سؤال ببرد. تأکید مجدّد برعدم وجود رابطه قطعی و دایمی بین "ژنوتیپ- فنوتیپ" در بیماری‌های پیچیده، می‌تواند پیام مطالعه حاضر باشد. البته این نتیجه (عدم پیوستگی) می تواند نتیجه ای "کاذب" نیز فرض گردد و آن حالتی است که به علت "کشنده" بودن نفروپاتی دیابتی، بخشی از بیمارانی که حامل "ژنوتیپ‌های پرخطر" بوده اند، به علت مرگ از جمعیت مورد مطالعه، حذف قبلی شده اند.

واژگان کلیدی: TGF-β1، ژنوتیپ، فنوتیپ، پلی مورفیسم، نفروپاتی دیابتی

۱- دانشگاه علوم پزشکی بابل

۲- دانشکده علوم بیولوژی، دانشگاه منچستر، انگلستان

۳- مرکز دیابت و بیمارستان رویال منچستر، انگلستان

* ***نشانی***: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم؛ تلفن: ۸۸۰۲۶۹۰۲-۳؛ نمابر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: javadbazzaz@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۲/۲۶

تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۱

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

مقدمه

ژنتیک و نفروپاتی دیابتی

نقش زمینه‌های وراثتی و عوامل ژنتیکی در میزان استعداد و یا مقاومت بیماران دیابتی در ابتلا به عوارض دیررس دیابت از دیرباز مورد توجه محققین بوده است. در میان عوارض دیررس دیابت، نقش عوامل ژنتیکی در نفروپاتی بیش از سایر عوارض بوده است. مشاهده «قالب‌های خانوادگی»[1] در ابتلا به نفروپاتی دیابتی در T1DM [۵-۱] و نیز در T2DM [۸-۶] نکته‌ای است که نقش عوامل خانوادگی را به وضوح نشان می‌دهد. همچنین نشان داده شده که خطر ابتلاء به پروتیینوری در نزد بیماران دیابتی به نحو قابل ملاحظه ای به وضعیت کلیوی والدین آنها مربوط است. بسته به‌این‌که هیچ یک از والدین، یکی از آنها یا هر دوی آنها به نفروپاتی مبتلا باشند، احتمال این خطر به ترتیب ۱۴، ۲۳ و ۴۶ درصد خواهد بود و این تفاوت پس از تطابق بیماران از نظر نحوه کنترل قند خون، پرفشاری خون و ... (رد دخالت توأمان سایر عوامل اتیولوژیک) همچنان پابرجاست[۶].

همچنین یافته‌های متعددی در نفروپاتی دیابتی بطور نسبی به عدم تناسب و تطابق میان یافته‌های بالینی از یک سو و شاخص‌های بیوشیمیایی (عمدتاً HbA_1c) از سوی دیگر اشاره دارند. در حالی‌که طول دوره بیماری دیابت دارای رابطه ای مستقیم و "خطی" با میزان بروز عوارض دیررس دیابت، می باشد و عموماً می‌بایست با افزایش طول دوره دیابت شاهد افزایش خطر ابتلا و میزان وقوع عوارض دیررس دیابت باشیم، این نکته در خصوص نفروپاتی دیابتی مصداق کاملی نداشته و در عمل با گذشت دو دهه از شروع دیابت، شانس ابتلا به این عارضه به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. تقریباً آغاز نفروپاتی دیابتی پس از دهه دوم از شروع بیماری دیابت، غیر معمول است. میزان وابستگی نفروپاتی دیابتی به سطح HbA_1c نیز در قیاس با سایر عوارض دیررس، ضعیف‌تر است. اگر HbA_1c را به عنوان عمده‌ترین شاخص هیپرگلیسمی بدانیم (مهم‌ترین عامل از مجموعه عوامل محیطی که در مقابل عوامل ژنتیکی(غیرمحیطی) در بروز عوارض دیررس دیابت نقش دارند)؛ این رابطه ضعیف‌تر شاید تلویحاً دلالت بر نقش بارزتر عوامل ژنتیکی در بروز و کنترل نفروپاتی در مقایسه با سایر عوارض مزمن دیابت داشته باشد؛ البته مطالعات اخیر نشان داده‌اند که حتی میزان هیپرگلیسمی و سطح HbA_1c که اصولاً به عنوان شاخص های محیطی شناخته می شوند، خود تا حد قابل توجهی توسط سازوکارهای ژنتیکی تنظیم و تعیین می‌گردند[۱۱-۹].

صرف نظر از وقوع فراوان‌تر و همراهی بیشتر رتینوپاتی و نوروپاتی دیابتی با بیماری دیابت (در قیاس با نفروپاتی دیابتی)، نتایج مطالعات آینده‌نگری که توسط گروه تحقیقی "DCCT" انجام گرفته نشان می‌دهد که میزان موفقیت در مهار پیشرفت و سیر بالینی نفروپاتی دیابتی با استفاده از رژیم انسولین درمانی اکید[2] که حدوداً ۵۴٪ بوده ، کمتر از دو عارضه رتینوپاتی (۷۰/۳٪) و نوروپاتی (۶۴٪) می باشد. الگوی مشابهی نیز برای میزان موفقیت در پیشگیری از نقص عضو[3] ثانوی به دیابت قابل مشاهده است. رژیم انسولین درمانی اکید قادر به پیشگیری از کوری (ثانویه به رتینوپاتی دیابتی) در ۹۰٪ موارد، قطع اندام (ثانویه به پای دیابتی) در ۹۵٪ موارد و نارسایی کلیوی (ثانویه به نفروپاتی دیابتی) در کمتر از ۵۰٪ موارد بوده است [۱۶-۱۲].

البته ذکر این شواهد به هیچ روی به منظور دست کم گرفتن نقش و سهم عوامل متابولیکی به‌ویژه هیپرگلیسمی در ایجاد و بروز نفروپاتی دیابتی و کلاً عوارض دیررس دیابتی نیست. بلکه هدف اولاً توجه به اختلاف بارزی است که در رفتار عوارض مختلف دیابت نسبت به متغیّرهای بیوشیمیایی و وضعیت متابولیکی مربوط به هیپرگلیسمی وجود دارد و ثانیاً توجیه‌پذیرتر نمودن مواردی است که وقوع و یا عدم وقوع عارضه (عوارض) دیررس نسبتاً مستقل از نحوه مراقبت‌های بالینی و شاخص‌های بیوشیمیایی می‌باشد.

این نکته که استفاده از رژیم اکید انسولین درمانی نمی‌تواند از وقوع عوارض مختلف دیابت بطور کامل ممانعت بعمل

[1] Familial clustering

[2] Intensive Insulin therapy

[3] Disability

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

آورد، بطور کلی نقش سایر عوامل را (بجز هیپرگلیسمی) در پاتوژنزاین عوارض مطرح می‌سازد. همچنین طی مطالعه‌ای نشان داده شده که حداقل ۲۰٪ از بیماران دیابتی نوع یک حتی پس از ۳ یا ۴ دهه از آغاز دیابت، مبتلا به هیچ یک از انواع عوارض دیررس دیابت از نظر بالینی نشدند که این مشاهده می‌تواند بر اهمیت پس‌زمینه‌های ژنتیکی و توارثی دلالت داشته باشد [۱۷].

روی هم رفته تفاوت قابل ملاحظه افراد دیابتی (صرف نظر از نحوه مراقبت‌های بالینی) در ابتلا یا مقاومت در برابر نفروپاتی دیابتی[1] و بالاخره تنوع گسترده‌ای که نزد بیماران مبتلا به این عارضه از نظر شدّت این عارضه و همچنین طول دوره دیابت (از زمان آغاز یا تشخیص تا شروع نفروپاتی) دیده می‌شود، شواهد مختلفی هستند که قویاً دخالت عوامل ژنتیکی را در این زمینه مطرح می‌نمایند.

سیر طبیعی[2] نفروپاتی دیابتی

در حالی‌که تنها تا حدود ۲ دهه قبل، وجود "میکروآلبومینوری پایدار"[3] در ۸۵٪ موارد به نفروپاتی آشکار[4] ختم می‌شده [۱۸]، امروزه این میزان حدوداً به ۵۰٪ تقلیل یافته است [۱۹]. به‌طور نسبی افزایش AER[5] (میزان ترشح آلبومین در ادرار) به میزان بیش از ۵٪ در سال معیاری است که نزد مبتلایان به میکروآلبومینوری پایدار، افراد "پیشرونده" را از "غیر پیشرونده" متمایز می‌کند[۲۰]. در افراد پیشرونده، زمان متوسط برای رسیدن به مرحله نفروپاتی از میکروآلبومینوری پایدار تقریباً ۹ سال بوده است [۱۹]. جدول ۱ مراحل مختلف ایجاد نفروپاتی دیابتی را نشان می‌دهد.

استناد به شاخص‌های "عملکردی" و مرجّح دانستن آن بر شاخص‌های «ساختمانی»[6] در درجه‌بندی سیر پیشرفت نفروپاتی دیابتی از این روی می‌باشد که در بسیاری از موارد افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی که از نظر وضعیت کارکرد کلیوی وضعیت مشابهی را داشته‌اند، تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای را از نظر شدّت درگیری ساختمانی نشان داده‌اند [۲۱].

پروتیینوری و ارزش پروگنوستیک آن

وجود پروتیینوری بیش از آن‌که نشانه‌ای برای سوء عملکرد کلیه‌ها باشد، در واقع علامتی است از وقوع یک ضایعه منتشر عروقی در قالب «کژکاری اندوتلیال»[7]، که البته محدود و منحصر به کلیه‌ها نمی‌باشد. وجود این ضایعات منتشر عروقی است که تفاوت ۱۰ برابر در میزان آسیب‌های قلبی- عروقی، مرگ‌ومیر و عوارضی همچون رتینوپاتی در بیماران مبتلا به پروتیینوری را در مقایسه با دیابتی‌های بدون پروتیینوری قابل توجیه می‌سازد. اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال و به‌طور مشخص پروتیینوری، عامل "تلفیق"[8] ضایعات عروقی کوچک و بزرگ یعنی بروز توأمان آنها می‌گردد و "آنژیوپاتی بدخیم"[9] عنوان گویایی است که اشاره به شدّت و وسعت ضایعات در سندرم های همراه با پروتیینوری دارد. به عنوان مثال نزد افراد مبتلا به T1DM، میزان وقوع رتینوپاتی پرولیفراتیو (PDR) بسته به وجود یا عدم وجود پروتیینوری به ترتیب ۸۰ و ۲۵ درصد گزارش شده است[۲۲].

TGF-β1 و نفروپاتی

TGF-β1 با برخورداری از قابلیّت‌ها و تأثیرات "Pro-fibrotic" و "Hypertrophic" نقش برجسته‌تر و نسبتاً پیشرویی را در بین مجموعه عوامل دخیل در ایجاد نفروپاتی دیابتی داراست. افزایش سریع و زودرس TGF-β1 در پاسخ به هیپرگلیسمی آنچنان است که حتی با گذشت ۲۴ ساعت از شروع هیپرگلیسمی این افزایش قابل مشاهده بوده است [۲۳]. هیپرگلیسمی با افزایش فعالیت آنزیم "PKC"، سبب تشدید نسخه‌برداری از ژن TGF-β1 می‌گردد که از طریق فعال شدن کمپلکس AP-1 صورت می‌پذیرد [۲۴].

[1] Inter-individual variation
[2] Natural history
[3] Persistent Microalbuminuria
[4] Overt Nephropathy
[5] Albumin excretion rate
[6] Structural
[7] Endothelial dysfunction
[8] Link
[9] Malignant angiopathy

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

جدول ۱- مراحل مختلف ایجاد نفروپاتی دیابتی [۱۸]

مرحله	توصیف
I	↑GFR & renal hypertrophy
II	Silent morphological (subclinical) change, GFR≥N
III	Incipient DN & persistent microalbuminuria & raised BP
IV	Overt DN (persistent proteinuria & ↓GFR)
V	ESRD (accompanied with uremia)

جدول ۲- توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلی‌مورفیسم‌های ژن TGF-β1 و پرایمر کنترل

PCR product Size	Sequence	Primer	Candidate Gene
241 bp	5'-TCCGTGGGATACTGAGACAC- 3' 5'-GCAGCGGTAGCAGCAGCG-3' 5'-AGCAGCGGTAGCAGCAGCA-3'	Generic primer Primer C (anti-sense) Primer T (anti-sense)	**TGF-β1 (codon 10)**
233 bp	5'-GGCTCCGGTTCTGCACTC-3' 5'-GTGCTGACGCCTGGCCG-3' 5'-GTGCTGACGCCTGGCCC-3'	Generic primer Primer G (sense) Primer C (sense)	**TGF-β1 (codon 25)**
429 bp	5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3' 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'	Sense: Antisense:	**HGH (Control Primer)**

افزایش موضعی (گلومرولی) و فراگیر TGF-β1 در جریان نفروپاتی دیابتی در مدل تجربی دیابت (STZ-diabetic rat) گزارش شده است. میزان این افزایش در سطح گلومرولی TGF-β1 حدوداً ۱۰- ۳ برابر بوده است [۲۵]؛ در حالی‌که افزایش موضعی این عامل رشد مربوط به افزایش بیان ژن TGF-β1 (افزایش TGF-β1 mRNA) بوده [۲۶]، افزایش فراگیر این عامل (Circulating TGF-β1)، بیشتر مربوط به آزادسازی این سیتوکاین از پلاکت‌هاست که مقادیر بالایی از این عامل را در خود به صورت ذخیره حمل می‌نمایند. افزایش "شکنندگی"[1] پلاکت‌ها در جریان دیابت علت اصلی در این آزادسازی بیش از اندازه است [۲۷].

از آنجایی‌که افزایش بیان ژن TGF-β1 و یا افزایش سطح سرمی آن با توجه به وضعیت غیرفعال[2] این عامل الزاماً به معنای افزایش فعالیت این عامل نمی‌باشد، در یک مطالعه میزان بیان پروتیین ماتریکس (که تحریک بیان این پروتیین منحصراً توسط TGF-β1 صورت می‌گیرد)، بررسی شد که افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد [۲۸]. از آنجا که افزودن TGF-β1 به محیط کشت سلول‌ها سبب هیپرتروفی این سلول‌ها می شود، مشاهدهٔ افزایش زودرس در بیان گلومرولی ژن TGF-β1 را یافته ای می دانند که باید با ایجاد هیپرتروفی کلیوی در مراحل ابتدایی نفروپاتی دیابتی مرتبط باشد [۲۶].

افزایش بیان ژن (TGF-β1 mRNA) و به تبع آن افزایش سطح پروتیین TGF-β1 با افزایش تشکیل ماتریکس (عمدتاً کلاژن نوع IV) در ساختمان کلیه‌ها همراه است که افزایش هرسه این موارد وابستگی مشخصی به وضعیت متابولیکی و سطح قند خون دارد. مثلاً در مدل حیوانی (STZ-induced) موش صحرایی، این افزایش در موش‌هایی که تحت درمان با انسولین نبوده‌اند، بیشتر از مدل‌هایی بوده که انسولین دریافت می کرده‌اند (diabetics > diabetics take insulin > controls > controls take insulin) [۲۹]. از سوی دیگر مطالعات مداخله ای نیز نقش

[1] Hyper-fragility
[2] Latent state

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

مهم TGF-β1 را در پاتوژنز نفروپاتی دیابتی مورد تأکید دوباره قرار دادند. در آزمایش های "in vitro" نشان داده شد که در سلول های مزانژیال، اثرات تحریکی ناشی از هیپرگلیسمی برتولید کلاژن نوع IV با استفاده از آنتی بادی Anti-TGF-β کاهش یافته [۳۰] و یا قابل پیشگیری است[۲۵]. نتایج مشابهی نیز در مطالعات "in vivo" حاصل شده است. تجویز آنتی بادی مونوکلونال TGF-β سبب پیشگیری از هیپرتروفی گلومرولی و کاهش وزن کلیه ها

جدول ۳- توزیع فراوانی ژنوتیپ آلل پلی‌مورفیسم ژن TGF-β1 در موقعیت کدون C/T*۱۰
در گروه کنترل (C)، بیماران T1DM (P)، دیابتی های مبتلا به نفروپاتی (DN^+) و دیابتی های غیر مبتلا (DN^-)

TGF-β1 codon 10*C/T	C تعداد(درصد)	P تعداد(درصد)	DN تعداد(درصد)	P value P/C	P value DN/C	P value DN^+/DN^-
ژنوتیپ						
CC	(۱۲/۵)۱۵	(۱۵/۷)۳۹	(۱۴)۱۲	۰/۵	۰/۹	۰/۷
CT	(۴۸)۵۷	(۵۰/۸)۱۲۶	(۵۰)۴۳			
TT	(۳۹/۵)۴۷	(۳۳/۵)۸۳	(۳۶)۳۱			
آلل						
C	(۳۶/۵)۸۷	(۴۱)۲۰۴	(۳۹)۶۷	۰/۲	۰/۶	۰/۵
T	(۶۳/۵)۱۵۱	(۵۹)۲۹۲	(۶۱)۱۰۵			

جدول ۴- توزیع فراوانی ژنوتیپ/آلل پلی‌مورفیسم ژن TGF-β1 در موقعیت کدون G/C*۲۵
در گروه کنترل (C)، بیماران T1DM (P)، دیابتی های مبتلا به نفروپاتی (DN^+) و دیابتی های غیر مبتلا (DN^-)

TGF-β at codon 25* G/C	C تعداد(درصد)	P تعداد(درصد)	DN تعداد(درصد)	P value P/C	P value DN/C	P value DN^+/DN^-
ژنوتیپ						
GG	(۸۱/۵)۹۷	(۸۱)۲۰۱	(۷۹)۶۸	۰/۹	۰/۹	۰/۸
GC	(۱۷/۶)۲۱	(۱۷/۸)۴۴	(۱۹/۸)۱۷			
CC	(۰/۹)۱	(۱/۲)۳	(۱/۲)۱			
آلل						
G	(۹۰/۳)۲۱۵	(۹۰)۴۴۶	(۸۹)۱۵۳	۰/۹	۰/۶	۰/۶
C	(۹/۷)۲۳	(۱۰)۵۰	(۱۱)۱۹			

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

به‌واسطه کاهش Matrix mRNA در موش های صحرایی دیابتی (STZ-induced) بدون تغییر گلوگز خون گردید [۳۱]. این نکته قابل ذکر است که در مطالعات تجربی معمولاً به علت شباهت بیشتر با نفروپاتی دیابتی انسانی، مدل موش صحرایی که با تجویز استرپتوزوتوسین دیابتی شده، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش‌ها

الف – بیماران

در مطالعه حاضر تعداد ۲۴۸ نفر از بیماران مبتلا به T1DM که از نژاد "بریتانیایی- قفقازی" بوده و در قالب بیماران ثبت شده طی سال‌های ۲۰۰۲– ۱۹۹۹ به درمانگاه سرپایی دیابت در شهر "منچستر" انگلستان مراجعه داشتند، به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. بیماران نسبت خانوادگی با یکدیگر نداشتند. بر حسب وجود یا عدم وجود نفروپاتی، بیماران به دو گروه تقسیم شدند:

۱- گروه فاقد نفروپاتی (DN^-): شامل ۱۶۲ نفر بود که حداقل مدت ۵ سال از زمان آغاز تشخیص بیماری T1DM آنها گذشته و آزمون پروتیینوری (Urine Albustix) آنها طی آزمایش‌های متوالی برای مدت حداقل ۱۲ ماه منفی بود.

۲- گروه دارای نفروپاتی (DN^+): ۸۶ نفر بود که آزمون پروتیینوری آنها حداقل در سه نوبت متوالی در طی ۱۲ ماه مثبت بود، یا آن‌که میزان ترشح پروتیین در ادرار ۲۴ ساعته آنها ادرار ۲۴ ساعته بیشتر از ۰/۵ گرم بود. این آزمایش‌ها بر روی نمونه "جریان میانی" ادرار[1] انجام شد و تشخیص پروتیینوری مثبت با رد احتمال وجود هماچوری و یا عفونت صورت گرفت.

ب- گروه شاهد (سالم)

این گروه شامل ۱۱۳ نفر بود که نسبت خانوادگی با یکدیگر نداشتند و بصورت تصادفی از جمعیت نژاد "بریتانیایی – قفقازی" انتخاب شدند. افراد این گروه و نیز بستگان درجه یک آنها به بیماری‌های مزمن از جمله دیابت مبتلا نبودند.

برای انجام این مطالعه ، پس از تأیید "پروپوزال" مربوطه در کمیته اخلاق پزشکی بیمارستان رویال منچستر (RoyalInfirmary)، رضایت افراد شرکت کننده نیز اخذ شد.

ج- تعیین آلل‌های پلی‌مورفیک

پس از تهیه نمونه خون محیطی از افراد و استخراج DNA از گلبول‌های سفید، آزمایش "ARMS – PCR" جهت تعیین نوع آلل‌های افراد دو گروه بیمار و شاهد در موقعیت پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه انجام گرفت. توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلی‌مورفیسم‌های مورد نظر و نیز پرایمر کنترل (که به قطعه‌ای از ژن هورمون رشد می‌چسبد) در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

یافته‌ها

توزیع پلی‌مورفیسم‌های مربوط به ژن TGF-β1 در موقعیت‌های کدون ۱۰ و کدون ۲۵ چه در سطح آلل و چه در سطح ژنوتیپ، تفاوت معناداری را میان گروه‌های بیمار و شاهد و نیز در زیر گروه‌های بیماران (دارای نفروپاتی و بدون نفروپاتی) چه بین یکدیگر و چه با گروه شاهد نشان نداد ($P = NS$) (جدول‌های ۳ و ۴).

در خصوص پلی‌مورفیسم مربوط به کدون ۱۰، درصد توزیع آلل T (که نسبت به آلل C تولید مقادیر بیشتری از پروتیین TGF-β1 را حسب مطالعات صورت گرفته و "ارزیابی‌های عملکردی" موجب می‌شود)، نزد بیماران مبتلا به نفروپاتی بیشتر ازبیماران بدون نفروپاتی بود ($P = NS$)، اما کماکان فراوانی کمتری را نسبت به گروه شاهد نشان می‌داد. البته فراوانی بیشتر آلل T (High producer variant) میان گروه شاهد را می‌توان به پتانسیل‌های ضد التهابی و فرآیندهای تنظیم ایمنی[2] سیتوکین TGF-β1 نسبت داد که احتمالاً می‌تواند سبب مقاومت نسبی افراد در برابر ابتلا به این بیماری خود ایمن شود. نزد گروه شاهد همین الگو یعنی فراوانی بیشتر آلل با قابلیت تولیدی بیشتر در مورد پلی‌مورفیسم مربوط به کدون ۲۵ مصداق داشته

[1] Midstream urine sample

[2] Immuno-regulatory

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

به طوری که آلل G (High producer variant) در جمعیت شاهد بیشتر از جمعیت بیمار بوده است (P = NS) .

بحث

با توجه به شواهد متعددی که در خصوص نقش مؤثر TGF-β1 در بروز و پیشرفت نفروپاتی دیابتی وجود دارد، انتظار می‌رفت که در بین جمعیت‌های مورد مطالعه تفاوت معناداری در توزیع آلل‌های مربوط به پلی‌مورفیسم‌های مورد بررسی (که پتانسیل‌های "عملی" آنها قبلاً گزارش شده) مشاهده گردد. عدم مشاهده چنین تفاوتی را می‌توان در قالب سناریوهای مختلفی تفسیر کرد:

۱- *اثر "بازمانده" (Survivor effect or Selective survival)* در مطالعات مقطعی همانند مطالعه حاضر، در صورتی که بیماری/ فنوتیپ مورد مطالعه یک صفت کشنده باشد (چنان‌که DN یک بیماری کشنده می‌باشد)، احتمال این نقیصه وجود دارد که در میان جمعیت مبتلا به آن صفت (DN)، درصدی از بیماران که حامل آلل‌های "پرخطر" و زمینه‌ساز آن صفت بوده‌اند در اثر آن بیماری فوت نموده‌اند و در واقع با حذف "قبلی" این بخش از آلل‌های مرتبط با بیماری، این آلل‌ها فراوانی"واقعی" خود را در جمعیت مبتلا به آن صفت (DN^+، هم در مقایسه با زیر گروه DN^- و هم گروه شاهد) ندارند و نتیجه مطالعه می‌تواند بطور کاذب منفی شده باشد (Under – representation of risky genotypes) .

۲- *نحوه انتخاب گروه DN^-* : از آن‌جا که احتمال ایجاد و یا آغاز نفروپاتی دیابتی به‌طور فزاینده‌ای تا ۲۰ سال پس از شروع بیماری دیابت ادامه دارد، دور از ذهن نیست اگر درصدی از بیماران این مطالعه که طول مدت ابتلای آنها به دیابت کمتر از ۲۰ سال بوده در صورت ادامه روند بیماری به نفروپاتی دیابتی دچار شوند. معنی این ملاحظه آن است که ممکن است بخشی از بیماران دیابتی باوجود دارا بودن ژنوتیپ پرخطر، به علت عدم مواجهه زمانی لازم با شرایط هیپرگلیسمیک، هنوز در وضعیت DN^- بسر می‌برند. در حقیقت بیماران بسته به میزان "نفوذ"[1] ژن بیماری‌زایی که حمل می‌کنند، نیاز به مدت‌های زمانی[2] متفاوتی برای بروز آن بیماری دارند و در صورت "نفوذ کم"[3] آن ژن/ ژنوتیپ، ممکن است با وجود حمل آن ژنوتیپ پرخطر، بیماری به سراغ آنها نیاید.

در کل، نقیصه اخیر یعنی افزایش غیرواقعی ژنوتیپ‌های پرخطر در جمعیت DN^- به همراه نقیصه قبلی که با کاهش غیرواقعی ژنوتیپ‌های پرخطر در جمعیت DN^+ خود را نشان می‌دهد، تنگناهایی[4] هستند که قدرت مطالعه را تقلیل داده، در نهایت می‌توانند به کسب نتایج منفی کاذب منجر گردند. تغییر رویکرد[5] مطالعه حاضر و انتخاب رویکرد "آینده نگر"[6] و پی‌گیری بیماران برای مدتی طولانی (مثلاً بیش از یک دهه) می‌تواند راهکار مناسبی برای رفع نقیصه‌های حاصل از ملاحظات پیش‌گفته باشد.

۳- یکی از ویژگی‌های بیماری‌ها و صفات پیچیده مثل دیابت و یا نفروپاتی دیابتی، عدم وجود رابطه قطعی و دایمی بین "ژنوتیپ- فنوتیپ" است. این مفهوم که اساس ماهیّت پیچیده این بیماری‌ها و اختلالات را از نظر زیر ساخت ژنتیکی آنها تشکیل می‌دهد، دلالت بر این نکته دارد که بر خلاف بیماری‌های تک ژنی[7] که از الگوی "مندلی" تبعیت می‌کنند، در بیماری‌های کمپلکس (پلی‌ژنیک / مولتی فاکتوریال) چنان رابطه "دوحالتی"[8] بین "ژنوتیپ – فنوتیپ" وجود ندارد و بسته به میزان این عدم قطعیّت، می‌توان مطالعات مشابهی را به وفور یافت که به بررسی نقش پلی‌مورفیسم‌های یکسان در بیماری/ فنوتیپ مشابهی پرداخته، اما به نتایج متفاوت و احیاناً متضادی ختم شده اند؛ آفتی که از آن به "تکرار ناپذیری[9] " "مطالعات پیوستگی[10]" یاد می شود [۳۲]. در این راستا می توان به دو مطالعه اشاره نمود، مطالعه ای که اخیراً با بررسی پلی مورفیسم مربوط به کدون ۱۰ نتیجه مثبتی را گزارش نموده [۳۳]؛ و مطالعهٔ دیگری که با وجود بکارگیری تعداد بیشتری از پلی مورفیسم‌های ژن TGF-β1

[1] Penetrance

[2] Duration of diabetes
[3] Low penetrance
[4] Pitfall
[5] Approach
[6] Prospective study
[7] Monogenic
[8] Dichotomy
[9] Irreproducibility
[10] Association studies

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

(سه پلی‌مورفیسم در ناحیه کد کننده و دو پلی مورفیسم در ناحیه پروموتور)، ارتباط مشخصی را بین این پلی‌مورفیسم‌ها و نفروپاتی دیابتی پیشرفته مشاهده نکرده است [۳۴].

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر به بررسی نقش TGF-β1 که بیشترین توجه محققین را در زمینه عارضه نفروپاتی دیابتی به خود معطوف داشته، پرداخته است. دو دسته از شواهد تجربی که دسته اول افزایش تولید/ ترشح این عامل رشد را در پاسخ به هیپرگلیسمی و دسته دوم که مقادیر افزایش یافته این واسطه را در جریان نفروپاتی دیابتی نشان داده‌اند، در معرفی و انتخاب این عامل بعنوان علت محوری نفروپاتی دیابتی مورد استناد قرار گرفته‌اند.

"Candidate gene association study" یکی از روش‌های مطالعه در مبحث ژنتیک بیماری‌هاست که در قالب ارائه فرضیه‌ای که خود مبتنی بر دو اصل می باشد (۱- وجود زمینه ژنتیکی قابل توجه برای بیماری/ فنوتیپ مورد مطالعه؛ ۲- نقش مشخص و شناخته شده واسطه مورد نظر در ایجاد آن بیماری/ فنوتیپ)، به عنوان بهترین روش برای مطالعه زیر ساخت ژنتیکی بیماری‌های کمپلکس، مورد اقبال وسیعی قرار گرفته است. این روش، پتانسیل "بیولوژیک" یا فنوتیپیک و ارزش بالینی یک (یا چند) پلی‌مورفیسم از ژن مربوط به واسطه مورد نظر را در بروز فنوتیپ/ بیماری (فراوانی، شدت و ....) مورد تحقیق به قضاوت می‌نشیند و مبنای آن، مقایسه فراوانی آلل‌های مربوط به آن پلی‌مورفیسم (ها) در بین دو جمعیت "شاهد" و "بیمار" است.

در مطالعه حاضر تفاوت معناداری در توزیع فراوانی آلل‌های پلی مورفیک انتخاب شده بین گروه‌ها/زیرگروه‌های افراد مورد مطالعه مشاهده نشد. انتشار نتایج منفی در مطالعات پیوستگی اولاً به دلیل اصلاح برداشت مخاطبان این مطالعات (که به‌واسطه عدم انتشار کافی نتایج منفی در ژورنال های پزشکی، تصور می کنند نتیجه این‌گونه مطالعات عموماً مثبت باید باشد) و ثانیاً جهت اطلاع و دعوت از محققین دیگر برای تکرار این مطالعه (با توجه به ضرورت انجام آن در "Association Studies") از اهمیت و اولویت ویژه ای برخوردار است.

مآخذ

1. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1989; 320: 1161-5.
2. Borch-Johnsen K, Kreiner S. Proteinuria: value as predictor of cardiovascular mortality in insulin dependent diabetes mellitus. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; 294: 1651-4.
3. Earle K, Walker J, Hill C, Viberti G. Familial clustering of cardiovascular disease in patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 1992; 326: 673-7.
4. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 940-5.
5. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 1997; 46: 1829-39.
6. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33:438-43.
7. Faronato PP, Maioli M, Tonolo G, Brocco E, Noventa F, Piarulli F, Abaterusso C, Modena F, de Bigontina G, Velussi M, Inchiostro S, Santeusanio F, Bueti A, Nosadini R. Clustering of albumin excretion rate abnormalities in Caucasian patients with NIDDM. The Italian NIDDM Nephropathy Study Group. *Diabetologia* 1997; 40: 816-23.
8. Canani LH, Gerchman F, Gross JL. Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 1999; 48: 909-13.
9. Snieder H, Sawtell PA, Ross L, Walker J, Spector TD, Leslie RD. HbA(1c) levels are genetically determined even in type 1 diabetes: evidence from healthy and diabetic twins. *Diabetes* 2001; 50: 2858-63.
10. Meigs JB, Panhuysen CI, Myers RH, Wilson PW, Cupples LA. A genome-wiDe scan for loci linked to plasma levels of glucose and HbA(1c) in a community-based sample of Caucasian pedigrees: The Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2002; 51: 833-40.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]

11. Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, Hattersley AT.Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* 2003; 362: 1275-81.
12. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
13. Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kidney Int* 1995; 47:1703-20.
14. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 1995; 44: 968-83.
15. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ophthalmology* 1995; 102: 647-61.
16. Skyler JS. Diabetic complications. The importance of glucose control. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25: 243-54.
17. Barnett AH. Pathogenesis of diabetic microangiopathy: an overview. *Am J Med* 1991; 90:67S-73S.
18. Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* 1984; 310: 356-60.
19. Krolewski AS, Warram JH, Freire MB. Epidemiology of late diabetic complications. A basis for the development and evaluation of preventive programs. Endocrinol Metab *Clin North Am* 1996; 25:217-42.
20. Almdal T, Norgaard K, Feldt-Rasmussen B, Deckert T. The predictive value of microalbuminuria in IDDM. A five-year follow-up study. *Diabetes Care* 1994; 17: 120-5.
21. Ziyadeh FN, Goldfarb S. The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1991; 39: 464-75.
22. Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Christlieb AR, Busick EJ, Kahn CR. Risk of proliferative diabetic retinopathy in juvenile-onset type I diabetes: a 40-yr follow-up study. *Diabetes Care* 1986; 9: 443-52.
23. Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K. Expression of transforming growth factor-beta 1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1994; 46: 430-42.
24. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990;10: 1492-7.
25. Bollineni JS, Reddi AS. Transforming growth factor-beta 1 enhances glomerular collagen synthesis in diabetic rats. *Diabetes* 1993; 42: 1673-7.
26. Sharma K, Ziyadeh FN. Renal hypertrophy is associated with up-regulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *Am J Physiol* 1994; 267: F1094-01.
27. Pfeiffer A, Schatz H. Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995; 103: 7-14.
28. Gilbert RE, Wilkinson-Berka JL, Johnson DW, Cox A, Soulis T, Wu LL, Kelly DJ, Jerums G, Pollock CA, Cooper ME. Renal expression of transforming growth factor-beta inducible gene-h3 (beta ig-h3) in normal and diabetic rats. *Kidney Int* 1998; 54: 1052-62.
29. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1814-8.
30. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1994; 93: 536-42.
31. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996;45: 522-30.
32. Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res*. 2005; 573: 54-69.
33. Patel A, Scott WR, Lympany PA, Rippin JD, Gill GV, Barnett AH, Bain SC; Warren 3/UK GoKind Study Group.The TGF-beta 1 gene codon 10 polymorphism contributes to the genetic predisposition to nephropathy in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2005; 22: 69-73.
34. Ng DP, Warram JH, Krolewski AS. TGF-beta 1 as a genetic susceptibility locus for advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus: an investigation of multiple known DNA sequence variants. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 22-8.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-24]