مجله دیابت و لیپید ایران. پاییز ۱۳۸۳؛ دوره ۴ (شماره ۱): ۱۸-۹

ژنتیک دیابت نوع یک: بررسی نقش ژن TNF-α

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

چکیده

مقدمه: دیابت نوع یک (T1DM)از جمله بیماری های "خود ایمن" (Autoimmune diseases) است که محدود به عضو (Organ-specific) بوده و دامنه آسیب نسجی در آن منحصر به سلول‌های بتای جزایر پانکراس می‌باشد. ارتشاح سلولهای لنفوسیت (Lymphocyte infiltration) در سلولهای بتا که "انسولیت" (Insulitis) نامیده می‌شود، می‌تواند جز آنکه به فرآیند " تخریب انتخابی" (Selective destruction) سلول‌های تولید کننده انسولین و ایجاد بیماری دیابت منتهی گردد، سرنوشت دیگری نیز داشته باشد که آن بهبودی کامل و بازگشت به وضعیت سلامت است (Benign Insulitis). از مجموعه عواملی که تعیین می‌کند کدامیک از این دو پی‌آمد یعنی "بیماری" و یا "سلامت" در دنباله انسولیت حاصل خواهد شد، پس زمینه ژنتیکی (Genetic background) افراد و همچنین شرایط ایمونولوژیک موجود در صحنه درگیری (Micro-environment) است.

روشها: مطالعه حاضر در قالب یک "Case-Control Association Study" به بررسی نقش پلی‌مورفیسم ژن ساتیوکاین TNF-α– 308*G/A در تعیین میزان استعداد ابتلاء به دیابت نوع یک در جمعیت "بریتانیایی- قفقازی" (British- Caucasians) می‌پردازد.

یافته‌ها: توزیع فراوانی آلل و ژنوتایپ حاصله از پلی‌مورفیسم یاد شده تفاوت معنی‌داری را از نظر آماری بین دو گروه بیماران دیابتی (۲۴۸ نفر) و افراد سالم(کنترل،۱۱۸ نفر)نشان نداد($P \geq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: از آنجا که نقش اساسی TNF-α[۴] در اتیوپاتوژنز دیابت نوع یک ثابت شده است، یافته‌های ما اولاً ممکن است دلالت بر عدم تأثیر پلی‌مورفیسم مطالعه شده بر عملکرد ژن مربوطه داشته باشد و یا آنکه تأثیرات این پلی‌مورفیسم در تعیین میزان نسخه‌برداری و غلظت نهایی محصول (پروتئین TNF-α) ناچیز بوده و مثلاً در عوض مکانیزم‌های "Post-transcription"، نقش اساسی‌تری را ایفاء نمایند.

واژگان کلیدی: ژنتیک، دیابت، ژنوتیپ، فنوتیپ، پلی مورفیسم، کمپلکس

۱- متخصّص ژنتیک پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بابل؛ مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز ومتابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشکده علوم بیولوژی، دانشگاه منچستر، انگلستان

۳- مرکز دیابت و بیمارستان رویال منچستر، انگلستان

[4] Tumor Necrosis Factor-α

---

* ***نشانی***: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم؛ تلفن: ۸۰۲۶۹۰۲-۳؛ نمابر: ۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: emrc@sina.tums.ac.ir.

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۸/۳۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۳/۹/۲۸

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

مقدمه

دیابت نوع یک (T1DM) شایع ترین بیماری "خود ایمن" (Autoimmune Diseases) محدود به عضو (Organ-specific) است که طی آن سلول‌های بتای جزایر پانکراس به طور اختصاصی آسیب می‌بینند [۱]. "انسولیت" (Insulitis) به عنوان مرحله مقدماتی در روند پاتوژنز T1DM، با ارتشاح سلولهای لنفوسیت (Lymphocyte infiltration) در سلولهای بتا همراه بوده و می‌تواند به جز بیماری دیابت، مسیر دیگری را هم طی کند وآن فروکش کردن التهاب و بازگشت به وضعیت سلامت است (Benign Insulitis) [۲].

پس زمینه ژنتیکی (Genetic background) افراد و همچنین شرایط ایمونولوژیک پدید آمده در صحنه درگیری (Micro-environment) از عوامل عمده ای هستند که سرنوشت بیولوژیک انسولیت را تعیین می‌کنند. اینکه واسطه‌های التهابی (Inflammatory mediators)، به طور عمده ساتیوکاین‌ها، در بستر این نوع واکنش‌های ایمنی به چه میزانی تولید و یا ترشح می‌شوند و در کل نحوه تعامل و کیفیت و کمیت پاسخ سلولهای پاسخ دهنده (Responder Cells) به علایم محرّک (Stimulatory Signals) چگونه است، عناصر بسیار کلیدی محسوب می‌شوند. به عنوان مثال در مدل‌های حیوانی BB Ratsو NOD mice، الگوی ساتیوکاین‌های مترشحه تا حد زیادی قابلیت پیش‌بینی سرنوشت "انسولیت" را به ما می‌دهد. مطالعات انجام گرفته در طی سال‌های اخیر نشان داده اند که در بسیاری از موارد، اجزاء و حتی تمامیّت یک واکنش التهابی یا پاسخ ایمنی و نتیجه نهایی بالینی آن (Outcome)، تحت کنترل عوامل وراثتی و ژنتیکی قرار دارند.

گرایش جدید "ایمونوژنتیک" عنوان مستقلی است که بر نگاه جامع‌تر و برگرفته از تلفیق دو حوزه "ایمونولوژی" و "ژنتیک" در پرداختن به عوامل و سیستم‌های تنظیمی ژنتیکی دخیل در فرآیند پاسخ‌های ایمنی تأکید دارد.

ایمونولوژی دیابت نوع یک: نقش TNF-α

افزایش ترشح (Over-expression) ساتیوکاین‌های "پیش برنده التهاب" (Pro-inflammatory cytokines) (شامل α- IL-1, TNF-α, IFN) و ساتیوکاین‌های نوع اول (Type 1 cytokines) (شامل IFN-γ, IL-2, IL-12, TNF-β) با ایجاد نوع تخریبی انسولیت (منجر شونده به دیابت)، ولی افزایش ترشح ساتیوکاین‌های نوع دوم (شامل IL-4, IL-10) و نوع سوم (TGF-β) با اشکال غیرتخریبی و رو به بهبود انسولیت همراهست [۳].

TNF-α به عنوان یک "تسریع کننده" (Accelerator) با برانگیختن افزایش بیان مولکول‌های MHC کلاس یک و نیز افزایش بروز مولکول‌های چسبان (Adhesion molecules) بر روی سلول‌های اندوتلیال عروقی، سبب افزایش‌نفوذ و هجوم سلول‌های ایمنی به جزایر پانکراس می‌گردد [۴]. در مطالعات In-vitro نشان داده شده که TNF-α با همراهی IFN-γ می‌تواند سبب بیان نابجای (Aberrant expression) مولکولهای MHC کلاس دو بر روی سلولهای جزیره‌ای گردد [۵]. طی مطالعه دیگری مشاهده شد که سطح سرمی TNF-α در نزد افرادی که به تازگی به دیابت نوع یک مبتلا شده‌اند در مقایسه با افرادی که به مدت طولانی از بیماری دیابت نوع یک آنها گذشته و نیز بیماران دیابت نوع دو و گروه شاهد (سالم)، بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر می‌باشد [۶].

TNF-α همچنین با القای تأثیرات "Apoptotic" سبب انهدام سلول‌های جزایر پانکراس شده و سپس سلول‌های دندریتیک (DCs) با دسترسی داشتن به آنتی ژنهای داخل سلولی این جزایر، موجب "پردازش" (Processing) و ارائه مؤثر این آنتی‌ژنها در قالب قطعات پروتئینی به سیستم ایمنی شده و در نتیجه سبب تحریک و تکثیر جمعیتی از سلول‌های T که ویژه سلول‌های جزیره‌ای اند (Islet-specific T cells)، می گردد [۴،۷]. از طرف دیگر ایجاد وقفه در عملکرد TNF-α از طریق حذف انتخابی و اختصاصی گیرنده آن (TNF-α-R1)، به طور قابل ملاحظه‌ای از ایجاد دیابت نوع یک ممانعت به عمل می‌آورد [۸].

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

ژنتیک دیابت نوع یک

دیابت نوع یک که از بیماری‌های چند عاملی پلی ژنیک محسوب می شود، تقریباً به عنوان نمونه ای "استاندارد" از این بیماری ها تلقی شده و تحت تحقیقات گسترده ای برای مطالعه زیرساخت ژنتیکی این بیماری ها قرار گرفته است.

با توجه به اینکه دوقلوها "محیط"های مشابهی را در زندگی پیش از تولد و (معمولاً) پس از تولد خود تجربه می‌کنند، وجود تفاوت قابل ملاحظه در "میزان بروز توأمان" (Concordance rate) دیابت نوع یک در بین دوقلوهای "همسان" (MZ-twins) (۳۶ – ۲۳٪) و "غیرهمسان" (DZ-twins)(۵٪) و نیز مقایسه این رقم ها با شانس ۶ درصدی ابتلاء به این بیماری برای فرزندان بیماران دیابتی و احتمال ابتلاء ۱/۴ – ۰/۴ درصدی برای جمعیت عادی، نشان دهنده نقش بسیار مهم عوامل ژنتیکی در اتیوپاتوژنز دیابت نوع یک می‌باشد.

نقش و اهمیت عوامل ژنتیکی در ایجاد دیابت نوع یک اگر چه کم رنگ تر از نقش این عوامل در دیابت نوع دو می‌باشد (با توجه به "MZ – twins concordance rate" که در اولی ۳۶ – ۲۳٪ و در دومی ۱۰۰ – ۹۰٪ است)، اما میزان موفقیت در کشف و شناخت عوامل ژنتیکی دیابت نوع دو به جهت برخورداری از یک زیر ساخت ژنتیکی "هتروژن" در قیاس با دیابت نوع یک ، محدودتر بوده است. البته نقش عوامل غیرژنتیکی (محیطی) هم در زمینه ایجاد دیابت نوع یک قابل تأمل است. با توجه به میزان بالای ۵۰ درصدی "عدم بروز توأمان" (Discordance rate) این بیماری در نزد دوقلوهای همسان (بیشترین میزان گزارش شده "بروز توأمان" دیابت نوع یک برای MZها حدود ۵۰٪ بوده که مشتمل بر بررسی و گذشت یک دوره ۴۰ ساله از زمان تشخیص/آغاز دیابت نوع یک در قل "Index" بوده است [۹])، می توان برآورد اولیه‌ای از دامنه تأثیرات این عوامل را به دست آورد [۱۰].

بخشی از این میزان "عدم بروز توأمان" البته به عوامل "ژنتیکی غیروراثتی" برمی‌گردد که در اثر فرآیندهای "Post – Zygotic" همانند وقوع "Genetic recombination" (طبق برنامه- تصادفی)، در ژن گیرنده سلولهای T (TCR) و ژن‌های ایمونوگلوبولین‌ها رخ می‌دهند و سبب می‌شوند که تا حدودی دوقلوهای همسان دارای"گنجینه" (Reportoire) متفاوتی از نظر TCR و یا ایمونوگلوبولین‌ها باشند. در تأیید این مطلب، وجود تفاوت در گیرنده سلولهای T (Skewed TCR repertoire) در نزد دوقلوهای همسانی که بروز غیرتوأمانی برای بیماری "مولتیپل اسکلروزیس" (MS) داشته‌اند، گزارش شده [۱۱] و از سوی دیگر یک "هموژنیتی" (در قالب برخورداری از الل‌های یکسان پلی‌مورفیک) در TCR سلول‌های "Germ line" در نزد دوقلوهای همسانی که بروز توأمانی برای دیابت نوع یک داشته‌اند، مشاهده شده است [۱۲].

ژنهای متعددی به عنوان ژنهای مسوؤل در روند ایجاد دیابت نوع یک معرفی گشته‌اند که تعدادی از این ژن‌ها توسط "کمیته نامگذاری نقشه ژنی انسان" (The Human Gene Mapping Nomenclature Committee) در قالبی نمادین از IDDM1 تا IDDM18 نامگذاری شده‌اند. در بین این ژن‌ها، نقش و جایگاه ژن‌های HLA (IDDM1)، به ویژه HLA-DRB, DQB, DQA ، منحصر به فرد بوده، به طوری که این ژن‌ها به تنهایی مسوؤل وجود نیمی از افزایش خطری هستند که در ابتلاء به دیابت نوع یک در فرزندان بیماران دیابتی مشاهده می‌شود (Field, 2002). این جایگاه مهم به نقش تعیین کننده‌ای برمی‌گردد که مولکول‌های HLA در تعیین سرنوشت سلول‌های T خود واکنشگر دارا هستند. بسته به میزان "تمایل" (Affinity) موجود بین مولکول HLA و آنتی‌ژن دیابتوژنیک که آیا منجر به برقراری اتصال "سست" یا "مستحکم" بین آن دو می‌شود، وضعیت متفاوت خواهد بود. اتصال "سست" موجب فرار سلول‌های T خود واکنشگر به محیط و ایجاد زمینه مناسب برای وقوع T1DM می گردد. اتصال محکم بین آن دو، حذف سلول‌های T خود واکنشگر در قالب فرآیند "انتخاب منفی" (Negative selection) را در تیموس سبب می‌شود [۱۳].

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

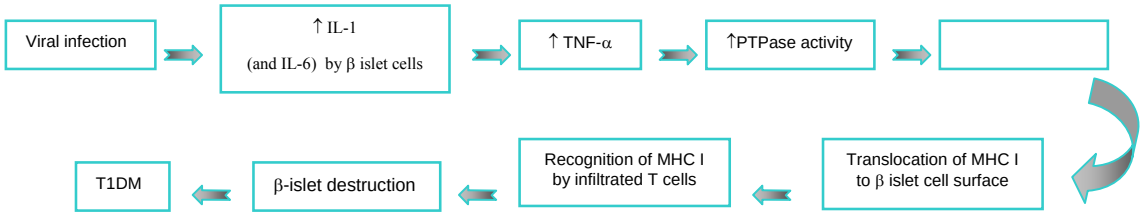
از دیگر عوامل ژنتیکی دخیل در ایجاد T1DM می‌توان به پلی مورفیسم ژن انسولین INS VNTR (IDDM2) و CTLA-4اشاره نمود[۱۵،۱۴].

در یک جمع بندی کلی می توان گفت وجود زمینه ژنتیکی در ابتلاء به دیابت نوع یک همچون سایر بیماریهای "خودایمن" ثانوی به نقایصی وراثتی است که در برقراری و تداوم "تحمل محیطی" (Peripheral Tolerance) نسبت به آنتی‌ژنهای خودی (در اینجا β-cell Autoantigens) رخ می‌دهند.

ایمونوژنتیک دیابت نوع یک: شواهد تجربی برای TNF-α

طی یک مطالعه برروی دوقلوهای همسان (Identical twins)، وقوع دیابت نوع یک در قلوی دومی که بر خلاف قلوی اول در زمان شروع مطالعه دچار بیماری T1DM نبوده، مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه که در قالب آینده نگر و طی مدت ۶ سال انجام شد، نشان داد که سطح سرمی TNF-α در قلوهای دومی که بعداً مبتلا به دیابت نوع یک شده‌اند، بیشتر از قلوهای دومی بوده که دچار آن نگردیده‌اند.

در شکل ۱ سیر پاتوژنز بیماری دیابت نوع یک با استفاده از مقاله Holden و همکاران به صورت مرحله به مرحله نشان داده شده است [۱۶]. در حالی که بخش عمده مطالعات صورت گرفته اشاره به تأثیرات برانگیزاننده و تشدید کننده TNF-α در ایجاد دیابت نوع یک دارند، دسته دیگری از مطالعات بالعکس تأثیرات TNF-α را مهاری و یا حمایتی ذکر نموده‌ا ند. به عنوان مثال بیان اختصاصی ژن TNF-α در محل جزایر بتا (Islet-specific TNF-α expression) در موش‌های بالغ NOD ترانس ژنیک، سبب ممانعت از ایجاد دیابت نوع یک گردید [۱۷]. همچنین تجویز سیستمیک TNF-α به موشهای بالغ NOD در دوره ۱۲ – ۷ هفتگی از سن آنها سبب جلوگیری از وقوع انسولیت و دیابت گردید [۱۸].



شکل ۱– نقش TNF-α در پاتوژنز دیابت نوع یک.

جدول ۱– توالی پرایمرهای طرّاحی شده برای پلی‌مورفیسم ژن G/A*۳۰۸–TNF-α و پرایمر کنترل.

نام ژن	توالي (Sequence)	نام پرایمر	اندازه محصول PCR
TNF-α (-308*A/G)	5’-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3’ 5’-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3’ 5’-AATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3’	Generic primer Primer G (sense) Primer A (sense)	184 bp
HGH (Control Primer)	5’-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3’ 5’-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3’	Sense: Antisense:	429 bp

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

مطالعات تکمیلی بعدی نشان دادند که نتیجه درمان‌های مداخله‌ای (Interventional treatments) در مدل‌های حیوانی مستعد به دیابت (مثل موش NOD)، بسته به سن میزبان در هنگام تجویز و با گستره بیان (Exposure/Expression) ماده مورد نظر (TNF-α) و درجه تکامل یافتگی (Maturity) سیستم ایمنی آنها، متفاوت است [۱۹]. بر این مبنا درمان با TNF-α از زمان تولد و یا از دو هفتگی در موش NOD، موجب تسریع و شتاب بیماری؛ ولی همین مداخله در سنین ۴ هفتگی و یا پس از آن سبب تأخیر و یا پیشگیری از بیماری می‌گردد.

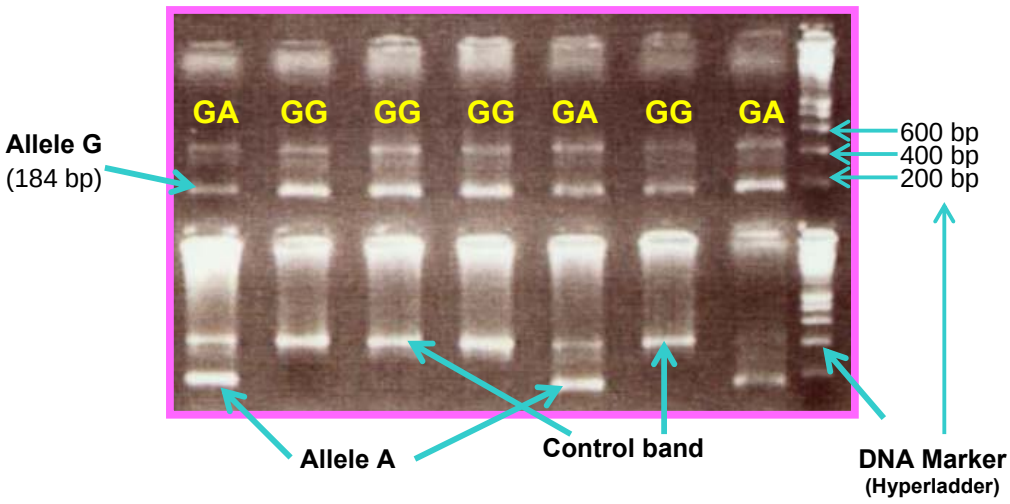
در مدل‌های حیوانی معمولی (Non-genetically susceptible)، مدت زمانی که در طول آن التهاب ناشی از اثر TNF-α تداوم دارد، اهمیت بیشتری دارد. دوره مربوط به ۲۵ – ۲۱ روز پس از شروع بیان TNF-α که درست در این مدت سرنوشت سلولهای T خودواکنشگر (Auto-reactive T cell) مشخص می‌شود، حضور یا عدم حضور TNF-α نتیجه و تأثیر نهایی را تعیین می‌کند [۲۰].

تأثیرات "Diabetogenic" ناشی از TNF-α مربوط به تأثیرات مستقیم آن بر روی سلول‌های بتا نبوده، بلکه در اصل ناشی از فراخوانی زودهنگام و فعال نمودن سلول‌های دندریتیک (DCs) و ماکروفاژها و سپس تشدید فرآیند برداشت آنتی‌ژن خودی و ارائه آن به سلول‌های ایمنی است [۲۱]. از سوی دیگر پتانسیل‌های سرکوب کننده ایمنی TNF-α تا حد زیادی مربوط به تأثیرات پیش برنده آن بر "آپوپتوز" سلولهای T خودواکنشگر و خاموش ساختن پاسخ‌های ایمنی نابجا [۲۲] و بالاخره تضعیف و کاهش فعالیت مربوط به مسیرهای انتقال سیگنال گیرنده سلول‌های TCR (TCR signal transduction) ثانوی به تأثیرات تحریکی مزمن ناشی از TNF-α می‌باشد [۲۳].

مطالعات متعددی همچنین نشان داده‌اند که برخی از تغییرات ساختمانی در ژن‌های مختلفی همچون ژن TNF-α با افزایش و یا کاهش میزان تولید (Expression) محصول آن ژن (پروتئین TNF-α) همراه هستند [۲۶، ۲۵،۲۴]. به عنوان مثال مشاهده شده است که پلی‌مورفیسم ژن TNF-α در موقعیت ۳۰۸*G/A– با میزان فعالیت نسخه برداری (Transcriptional

شکل ۲- تصویر محصول ARMS- PCR مربوط به پلی‌مورفیسم TNF-α–308*G/A بر روی ژل آگاروز.

(ژنوتایپ افراد مختلف نیز مشخص شده است).



[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

جدول ۲- توزیع فراوانی ژنوتایپ/الل پلی‌مورفیسم TNF-α-۳۰۸*G/A در گروه کنترل (C) و بیماران T1DM (P).

TNF-α -۳۰۸*G/A	C n (%)	P n (%)	P value P/C
ژنوتایپ			
GG	۷۳(۶۲)	۱۳۶(۴۵/۵)	۰/۳
GA	۳۹(۳۳)	۹۱(۳۷)	
AA	۶(۵)	۲۱(۸/۵)	
آلل			
G	۱۸۵ (۷۸/۴)	۳۶۳(۷۳)	۰/۱۳
A	۵۱(۲۱/۶)	۱۳۳(۲۷)	

(Activation) آن ارتباط دارد [۲۷]. دراین میان گزارش‌های چندی الل A را به عنوان الل "تولید کننده مقدار بیشتر"(High producer) [۲۶، ۲۷] و گزارش‌های دیگری الل G را به این عنوان معرفی نموده‌اند [۲۵، ۲۴]. هر چند دسته دیگری از مطالعات اصولاً قابلیت‌های عملی (Functionality) این پلی‌مورفیسم را بکلی نفی نموده‌اند [۲۸،۲۹].

روش‌ها

الف – گروه شاهد (Healthy Controls)

جمعیت این گروه (۱۱۸ نفر) از بین افرادی انتخاب شدند که سالم بوده و سابقه هیچ بیماری مشخص یا مزمنی (از جمله دیابت) بین آنها و همچنین بستگان درجه اول (First degree relatives) آنها موجود نبوده است. این افراد که به طور تصادفی انتخاب گردیدند، نسبت خانوادگی با یکدیگر نداشتند. همه افراد این جمعیت از نژاد "بریتانیایی- قفقازی" بودند.

ب ـ بیماران

جمعیت بیمار از بین قریب به ۵۰۰۰ بیمار دیابتی که در "مرکز دیابت منچستر" در انگلستان دارای پرونده و سابقه مشخص بیماری دیابت بودند، تعداد ۲۴۸ نفر آنها که به بیماری دیابت نوع یک مبتلا بوده و در طول سال‌های ۲۰۰۲ – ۱۹۹۹ به این کلینیک سرپایی مراجعه داشته و در هنگام مراجعه حداقل ۵ سال از زمان آغاز و تشخیص بیماری دیابت آنها گذشته بود، به صورت تصادفی انتخاب شدند. تمامی افراد بیمار، از نژاد "بریتانیایی- قفقازی" و فاقد رابطه خویشاوندی با یکدیگر بودند.

قبل از شروع مطالعه، "پروپوزال" مربوط به این مطالعه در کمیته اخلاق پزشکی بیمارستان رویال منچستر (Manchester Royal Infirmary) مطرح و تأیید گردید و رضایت کلیه افراد شرکت کننده در این مطالعه اخذ شد.

ج ـ تعیین نوع ژنوتیپ و آلل پلی‌مورفیک:

در ابتدا حدود ۵ ml خون محیطی از افراد مورد مطالعه تهیه و سپس DNA استخراج و تهیه گردید. جهت انجام PCR از

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

بین تکنیک‌های موجود، روش ARMS-PCR[5] به علت سهولت و سرعت انجام و در عین حال دقت قابل قبول، انتخاب و پس از طراحی پرایمرهای ویژه برای هر پلی‌مورفیسم و نیز طراحی پرایمر کنترل که قطعه هدف، "قسمتی از DNA مربوط به ژن هورمون رشد انسانی" (غیرپلی‌مورفیک در بین انسان‌ها) بوده، "Set up" لازم جهت تایپ کردن هر یک از پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه، صورت گرفت (جدول ۱).

در نهایت محصول PCR که در واقع حاوی تعداد بسیار بالایی (چندین میلیون کپی) از توالی مورد نظر DNA (دربردارنده موقعیت پلی‌مورفیک مورد مطالعه) می‌باشد، بر روی ژل آگاروز نشانده و پس از"الکتروفورزیس" و طی تابش اشعه ماوراء بنفش، ضمن مشاهده و مقایسه نوارهای DNA، نوع ژنوتیپ و الل مشخص گردید (شکل ۲).

یافته‌ها

توزیع فراوانی آلل و ژنوتایپ حاصله از پلی‌مورفیسم یاد شده، تفاوت معنی‌داری را از نظر آماری بین دو گروه بیماران دیابتی (۲۴۸ نفر) و افراد سالم (کنترل، ۱۱۸نفر) نشان نداد (P≥ ۰/۰۵)(جدول ۲).

بحث

علیرغم آنکه در غالب مطالعات صورت گرفته نقش فعال و اثرگذار TNF-α به عنوان یک "واسطه" (Mediator) و در عین حال "تنظیم کننده" (Regulator) پاسخ‌های ایمنی مورد تأکید قرار گرفته که البته در زمینه ایجاد دیابت نوع یک عده ای تأثیرات "تشدید کننده" و برخی نیز آثار "تخفیف دهنده" را برای آن در نظر گرفته‌اند، اما در مربوط دانستن این نقش (صرف نظر از نوع نتیجه آن) به ساختمان ژنی TNF-α، بحث‌های جدّی وجود دارد.

اینکه طی رشته‌ای از مطالعات، تغییرات سطح سرمی و یا موضعیTNF-α به نوع تغییرات و آرایش ساختمانی (پلی‌مورفیسم) ژن آن نسبت داده شده و یا در سطحی وسیع‌تر، یک پیوستگی آماری بین نوع پلی‌مورفیسم این ژن (آلل‌های ژن) و پدیده‌های التهابی و بیماری‌های خود ایمن همچون دیابت نوع یک گزارش شده، یافته‌ها و مطالبی هستند که یک اجماع کلی (Consensus) برروی آن وجود ندارد.

از آنجایی که ژن TNF-α بر روی کروموزوم شماره ۶ و در مجاورت ژن مربوط به MHC کلاس دو قرار دارد، برخی وجود پیوستگی (Association) بین تغییرات ساختمانی (پلی‌مورفیسم) ژن TNF-α و دیابت نوع یک را یافته‌ای ثانویه دانسته و ضمن معرفی HLA-DR یا HLA-DQ به عنوان عامل اصلی، وجود این پیوستگی را نتیجه "Haplotypic Linkage Disequilibrium" و انتقال مشترک یا توزیع توأمانی می‌دانند که انواع خاصی از آلل‌های این ژن‌ها در بین جمعیت‌های مختلف نشان می‌دهند و مثلاً وجود آلل A در ژن TNF-α بیش از مواردی که حسب "اتفاق" و شانس محتمل است، مثلاً با آلل B از ژن HLA، همراهی دارد [۳۲-۳۰].

نکته دیگری که چنین نقش اوّلیه و بالادست برای تغییرات ژنی TNF-α (و نیز پلی‌مورفیسم‌های سایر ژن‌ها) را مورد تردید قرار می‌دهد، عدم اخذ نتایج همسو از مطالعاتی است که مثلاً پلی‌مورفیسم (های) مشابهی را در بیماری واحدی مورد بررسی قرار داده‌اند. این نقیصه که به طور شایعی در بیماری‌های کمپلکس مشاهده می شود، "Irreproducibility" نام دارد و هشدار می‌دهد که نتایج مطالعاتی که در قالب "مطالعه پیوستگی" (Association Study) بین یک یا چند پلی‌مورفیسم از ژنی با بیماری مشخصی صورت می‌گیرد، تنها در هنگامی قابل اعتماد می‌باشند که حداقل در چند نوبت و توسط گروههای مختلف انجام گرفته و به اخذ نتایج مشابهی منجر گردند. بنابراین مطالعه‌ای که برای نوبت نخست وجود یک "پیوستگی" را گزارش می‌کند، بیش از آنکه اهمیت بیولوژیک و یا کاربردی- بالینی آن یافته را مطرح نماید، در

[5] Amplification Refactory Mutation System – Polymerase Chain Reaction

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

واقع یک اعلام دعوتی است که محققین دیگر را به تکرار همان مطالعه و محک دوباره نتایج فرا می‌خواند.
متأسفانه از بین بیش از ۶۰۰ مطالعه‌ای که تا سال ۲۰۰۲ وجود یک "پیوستگی" (Positive association) را گزارش نموده‌اند، بیش از ۴۰۰ مورد از آنها برای بیش از دو نوبت مورد بررسی مجدد واقع نگردیدند و از بین ۱۶۶ مطالعه‌ای که یافته پیوستگی آنها مثبت بوده است و سپس برای حداقل ۳ نوبت یا بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند، تنها ۶ مورد از آنها با اخذ نتایج مشابه با مطالعه نخست (یافته مثبت) همخوان بوده‌اند [۳۳]. البته این "بیلان" مأیوس کننده، از ارزش و اولویت مطالعات پیوستگی به عنوان تنها روش بررسی زمینه ژنتیکی بیماری‌های کمپلکس نمی‌کاهد، بلکه تنها اهمیت تکرار مطالعات صورت گرفته و این بار ضرورت انجام "کار تکراری" را یادآوری می‌کند. بالاخره اینکه یافته‌های یک مطالعه پیوستگی حتی در صورت مورد تأیید واقع شدن توسط مطالعات بعدی به واسطه رابطه شکننده "ژنوتیپ- فنوتیپ" در بیماری‌های کمپلکس (برخلاف بیماریهای منوژنیک)، قطعیت بالایی نداشته و ارزش آن نسبی است. در مداخلات درمانی (Interventional therapies) و سرانجام "طبّ پیشگیری" (Preventive Medicine) استفاده از یافته‌های به دست آمده از مطالعات پیوستگی جایگاه ویژه‌ای دارد.

نتیجه‌گیری

صرف نظر از نقش تحریک کننده (Provocative) و یا حمایتی (Protective) TNF-α در ایجاد دیابت نوع یک که بستگی به سن میزبان (Immune System Maturity) در زمان مواجهه با این سایتوکاین و نیز طول مدت زمان و گستره مواجهه (موضعی، بافتی یا سیستمیک) با آن دارد، عده‌ای از محققین در خصوص ناشی شدن این نقش از ساختمان ژنی آن و اینکه این، نوع آرایش ساختمانی ژن TNF-α (آلل‌ها) هست که نتیجه اثر TNF-α را در صحنه درگیری (مثلاً از طریق تعیین و تنظیم سطح سرمی و یا موضعی پروتئین TNF-α) مشخص می‌کند، تردید جدّی دارند.
با توجه به مجموع مطالعات صورت گرفته به‌نظر می‌رسد، نقش عمل کننده (Functional) آلل‌های ژن TNF-α در نزد کلیه افراد یکسان نبوده و دامنه تأثیرات کمّی آن در تنظیم و یا تغییر سطح بیان شده پروتئین TNF-α، بسته به افراد مختلف متفاوت است. این تفاوت عمدتاً به پس زمینه‌های ارثی و نژادی افراد و همچنین دینامیسم مربوط به تغییرات سایر عوامل (گیرنده‌ها، پروتئین‌های متصل شونده، سایر سایتوکاین‌های مرتبط، عوامل رشد و ...) و بالاخره "چیدمان" (Setting) ساختمان سایر ژن‌هایی که با ژن TNF-α در تنظیم و کنترل یک پاسخ ایمنی مشارکت و تداخل دارند، برمی‌گردد و این گونه نیست که مثلاً یک یافته "مرفومتریک" بسیار مرکّب و فنوتیپ پیچیده‌ای چون تخریب سلولهای بتا و یا دیابت نوع یک که خود برآیندی از تأثیرات متقابل مجموعه‌ای از عوامل گوناگون است، بتواند در تمامی موارد تنها با مطالعه نقش یک عامل قابل توجیه و تبیین باشد.
می‌توان در یک نگاه "خوش‌بینانه" (Optimistic) عدم حصول تفاوت معنی دار در فراوانی آلل‌های TNF-α – 308*G/A بین دو گروه بیمار و کنترل را در مطالعه حاضر معلول تعداد کم نمونه‌ها دانست و ادعا کرد تأثیر اندک یک ژن (آن هم تنها یک پلی‌مورفیسم از آن ژن) در ایجاد دیابت نوع یک از کل مجموعه ژن‌هایی که در ایجاد این بیماری "چندعاملی/پلی‌ژنیک" یا کمپلکس دخالت دارند، مانع از آن می‌شود تا بتوان با چنین حجم نمونه‌ای موفق به دریافت و کشف آن رابطه ضعیف گردید و لذا تکرار مطالعه با حجم بیشتر نمونه‌ها را جهت پرهیز از "False Negative results" توصیه نمود.از سوی دیگر و با نگاهی "بدبینانه" (Pessimistic) می‌توان بسته به شعاع دایره نقدی که برای نقش TNF-α و به ویژه پتانسیل‌های پاتوژنیکی از آن که در قالب مکانیزم‌های "Gene-regulatory based" قایل هستیم، عدم پیوستگی(No association) به دست آمده از مطالعه حاضر را در سطوح مختلفی با سناریوهای متفاوت، مورد تجزیه و تحلیل قرار داد:

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

نتیجه مطالعه حاضر ممکن است در کل دلالت بر عدم نقش تعیین کننده TNF-α (در حدی که بتواند به تنهایی تعیین تکلیف کند)، در ایجاد دیابت نوع یک داشته و یا حداقل بیانگر عدم احراز پتانسیل‌های بیولوژیک و عملکردی (Functional) لازم برای پلی‌مورفیسم مورد مطالعه در رابطه با دیابت نوع یک باشد.

در استخدام یک پلی‌مورفیسم به عنوان "نشانگر" (Marker)، نکته کلیدی آن است که تا چه اندازه آن پلی‌مورفیسم با میزان بیان و سطح فعالیت محصول ژن ارتباط بیولوژیک دارد. در صورت نداشتن چنین قابلیت‌ها و کارکردهای بیولوژیکی، یک پلی‌مورفیسم به تنهایی نمی‌تواند در بررسی رابطه "ژنوتیپ- فنوتیپ" یک "نشانگر ژنتیکی" واجد ارزش و "آگهساز" (Informative) باشد.

مآخذ

1. Andre-Schmutz I, Hindelang C, Benoist C, Mathis D. Cellular and molecular changes accompanying the progression from insulitis to diabetes. *Eur J Immunol* 1999; 29: 245-55.
2. Kolb H. Benign versus destructive insulitis. *Diabetes Metab Rev* 1997; 13: 139-46.
3. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Metab Rev 1998;14:129-51.
4. Grewal IS, Grewal KD, Wong FS, Picarella DE, Janeway CA, Jr., Flavell RA. Local expression of transgene encoded TNF alpha in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells. *J Exp Med* 1996; 184: 1963-74.
5. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldmann M. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 1987; 326: 304-6.
6. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SS, Hawa M, Viberti GC, Watkins PJ, Leslie RD, Vergani D. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 60-9.
7. Cleveland JL, Ihle JN. Contenders in FasL/TNF death signalling. *Cell* 1995; 81: 479-82.
8. Pakala SV, Chivetta M, Kelly CB, Katz JD. In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1999; 189: 1053-62.
9. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 2001; 44: 354-62.
10. Field LL. Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia* 2002; 45: 21-35.
11. Utz U, Biddison WE, McFarland HF, McFarlin DE, Flerlage M, Martin R. Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlates with multiple sclerosis. *Nature* 1993; 364: 243-7.
12. Millward BA, Welsh KI, Leslie RD, Pyke DA, Demaine AG. T cell receptor beta chain polymorphisms are associated with insulin-dependent diabetes. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 152-7.
13. Ridgway WM, Fathman CG. The association of MHC with autoimmune diseases: understanding the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 86: 3-10.
14. Thomson G, Robinson WP, Kuhner MK, Joe S, Klitz W. HLA and insulin gene associations with IDDM. *Genet Epidemiol* 1989; 6: 155-60.
15. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der AB, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1075-80.
16. Holden RJ, Pakula IS, Mooney PA. Tumor necrosis factor-alpha: a continuum of liability between insulin-dependent diabetes mellitus, non-insulin-dependent diabetes mellitus and carcinoma (review). *Med Hypotheses* 1999; 52: 319-23.
17. Green EA, Flavell RA. Tumor necrosis factor-alpha and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol Rev* 1999; 169: 11-22.
18. Jacob CO, Aiso S, Michie SA, McDevitt HO, Acha-Orbea H. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 968-72.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]

19. Christen U, Wolfe T, Mohrle U, Hughes AC, Rodrigo E, Green EA, Flavell RA, von Herrath MG. A dual role for TNF-alpha in type 1 diabetes: islet-specific expression abrogates the ongoing autoimmune process when induced late but not early during pathogenesis. *J Immunol* 2001; 166: 7023-32.
20. Green EA, Flavell RA. The temporal importance of TNFalpha expression in the development of diabetes. *Immunity* 2000; 12: 459-69.
21. Green EA, Eynon EE, Flavell RA. Local expression of TNFalpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. Immunity 1998; 9: 733-43.
22. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995; 377: 348-51.
23. Cope AP, Liblau RS, Yang XD, Congia M, Laudanna C, Schreiber RD, Probert L, Kollias G, McDevitt HO. Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signalling. *J Exp Med* 1997; 185: 1573-84.
24. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk PM, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Pena AS. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996; 43: 456-63.
25. Louis E, Satsangi J, Roussomoustakaki M, Parkes M, Fanning G, Welsh K, Jewell D. Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 39: 705-10.
26. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391-9.
27. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosi factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3195-9.
28. Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe AC, Szymanska B, Tronczynska E, Plucienniczak A, Selmaj K. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J Neuroimmunol* 1998; 84: 198-206.
29. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de GL, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997; 72: 149-53.
30. Pociot F, Wilson AG, Nerup J, Duff GW. No independent association between a tumor necrosis factor-alpha promotor region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; 23: 3050-3.
31. Deng GY, Maclaren NK, Huang HS, Zhang LP, She JX. No primary association between the 308 polymorphism in the tumor necrosis factor alpha promoter region and insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum Immunol* 1996; 45: 137-42.
32. Cox A, Gonzalez AM, Wilson AG, Wilson RM, Ward JD, Artlett CM, Welsh K, Duff GW. Comparative analysis of the genetic associations of HLA-DR3 and tumour necrosis factor alpha with human IDDM. *Diabetologia* 1994; 37: 500-3.
33. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002; 4: 45-61.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-10-18]