

بررسی ارتباط پلی مورفیسم C677T ژن متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز با نفروپاتی دیابتی

سعیده عسگریک^۱، مهسا محمد آملی^{۲*}، سیدعبدالحمید انگجی^۱، فریده رضی^۳، انسیه نسلی اصفهانی^۳

چکیده

مقدمه: نفروپاتی دیابتی یکی از مهم‌ترین عوارض میکروواسکولار دیابت است. دیابت یک اختلال متابولیک بوده که هایپرگلیسمی مزمن مهم‌ترین علامت آن است که منجر به اختلال در کلیه، و در نهایت از دست دادن کامل عملکرد کلیه می‌شود. ژن متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید در نفروپاتی دیابتی مطرح شده است. پلی مورفیسم C677T در این ژن منجر به کاهش عملکرد کاتالیتیکی آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز و افزایش سطوح هموسیستئین پلاسما می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم C677T با نفروپاتی دیابتی می‌باشد.

روش‌ها: این مطالعه از نوع مورد و شاهد بوده و در سه گروه ۳۰۰ نفری شامل گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ و نفروپاتی (N=۱۰۴)، مبتلا به دیابت نوع ۲ و بدون نفروپاتی (N=۱۰۰) و کنترل (افراد سالم) (N=۹۶) می‌باشد. پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR با استفاده از روش PCR-RFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتورهای بیوشیمیایی نیز در افراد مورد مطالعه اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مطالعه نشان می‌دهد که میان فراوانی ژنوتیپی گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی و گروه دیابتی بدون نفروپاتی اختلاف معنی‌دار وجود دارد (OR: ۰/۵، CI: ۰/۳-۰/۹، P=۰/۰۲). بین فراوانی اللی در دو گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی و دیابتی بدون نفروپاتی از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد (OR: ۱/۷۵۴، CI: ۱/۱۲۳-۲/۷۴۰، P=۰/۰۱۳).

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان می‌دهد که بین پلی مورفیسم C677T با نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو ارتباط وجود دارد. به بیان دیگر ال C سبب استعداد ابتلا به نفروپاتی شده و ال T دارای نقش حفاظتی در ابتلا به این بیماری می‌باشد.

واژگان کلیدی: نفروپاتی دیابتی، متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز، پلی مورفیسم، rs1801133

۱- گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

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

***نشانی:** خیابان کارگر شمالی، خیابان جلال آل احمد، بیمارستان شریعتی، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۲۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: amolimm@tums.ac.ir

مقدمه

هایپرگلیسمی مزمن دیابت با عوارض طولانی مدت، اختلال در عملکرد و عدم عملکرد ارگان‌های زیادی از جمله چشم‌ها، کلیه‌ها، اعصاب، قلب و رگ‌های خونی ارتباط دارد [۱]. شیوع جهانی دیابت شیرین به دنبال پیری جمعیت، شهری شدن و تغییرات سبک زندگی به سرعت در حال افزایش است، چرا که تعداد بیماران مبتلا به دیابت در طی سه دهه‌ی اخیر دو برابر شده است [۲، ۳]. در سال ۲۰۱۰ تعداد افراد مبتلا به دیابت ۲۸۵ میلیون نفر تخمین زده شده که ۹۰ درصد آنان را افراد مبتلا به دیابت نوع دو تشکیل می‌دهند، پیش‌بینی می‌شود که این میزان به ۴۳۹ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ برسد [۴، ۵]. یکی از شایع‌ترین عوارض میکروواسکولار دیابت، نوروپاتی دیابتی می‌باشد در واقع نوروپاتی دیابتی یک اختلال متابولیک ناشی از هایپرگلیسمی مزمن بوده که سبب اختلال در عملکرد طیف وسیعی از سلول‌های کلیه شده و در نهایت منجر به از دست دادن کامل عملکرد کلیه می‌شود [۵]. این بیماری ۳۰٪ از افراد مبتلا به دیابت نوع یک و ۲۵-۴۰٪ از افراد مبتلا به دیابت نوع دو را درگیر می‌کند [۶]. مشخصه‌ی نوروپاتی دیابتی، افزایش مداوم میزان آلبومین ادرار، کاهش پیشرونده‌ی میزان فیلتراسیون گلومرولی و افزایش فشارخون شریانی است. Seaquis و همکاران اعلام کردند که شیوع نوروپاتی در خواهران و برادران دیابتی افرادی که مبتلا به نوروپاتی دیابتی شده‌اند ۸۳٪ می‌باشد این درحالی است که شیوع آن تنها ۱۷٪ در خواهران و برادران دیابتی بیماران دیابتی بدون پروتئینوری می‌باشد [۷]. از سوی دیگر میزان شیوع این بیماری در برخی از گروه‌های نژادی از جمله هندی‌های پیما و سیاه‌پوستان نسبت به سفیدپوستان بسیار بالاتر است. این تفاوت نژادی ممکن است ناشی از نقش لوکوس‌های ژنتیکی خاصی در استعداد ابتلا به این بیماری باشد [۸].

ژن متیلن تترا هیدروفولات ردکتاز^۱ بر روی کروموزوم شماره‌ی یک (1p36.3) قرار داشته و دارای ۱۳ اگزون است.

¹ Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR)

این ژن واکنش تبدیل ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات به ۵-متیلن تتراهیدروفولات را کاتالیز می‌کند. ۵-متیلن تتراهیدروفولات کوسوبسترای مورد نیاز برای متیله شدن مجدد هموسیستئین و تبدیل آن به متیونین می‌باشد. هموسیستئین از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب کاهش حیات سلول‌های تولیدکننده‌ی انسولین شده که در نهایت منجر به کاهش فعالیت فسفریلاسیون آنزیم گلوکوکیناز، کاهش حساسیت در پاسخ به ترشح انسولین و مرگ سلولی می‌شود. به‌علاوه نشان داده شده است که نوروپاتی دیابتی مهم‌ترین عامل افزایش غلظت هموسیستئین تام در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو می‌باشد چرا که در نوروپاتی توانایی کلیه‌ها در پاکسازی هموسیستئین کاهش می‌یابد [۹]. یکی از پلی مورفیسم‌های رایج در ژن MTHFR که در جایگاه کاتالیتیک آنزیم قرار دارد، پلی مورفیسم C677T(rs1801133) در اگزون شماره‌ی ۴ و موقعیت ۲۲۲ می‌باشد که در این پلی مورفیسم باز آلانین به والین تبدیل می‌شود. این واریانت ایجاد شده از لحاظ ساختاری حساس به حرارت بوده و فعالیت کاتالیتیکی آن که تثبیت فولات است نیز کاهش می‌یابد [۱۰]. پلی مورفیسم C677T در آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز سبب کاهش مقاومت دمایی آنزیم در دمای ۳۷° و بالاتر می‌شود. عملکرد آنزیم در فرم هموزیگوت ۵۰ تا ۶۰ درصد کمتر از حالت نرمال در دمای ۳۷° سانتی‌گراد و ۶۵ درصد کمتر در دمای ۴۶° نسبت به فرم وحشی می‌باشد [۱۱]. پلی مورفیسم C677T از دست دادن فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید (کوفاکتور) را تسهیل کرده و در نتیجه سبب ایجاد یک پروتئین حساس به حرارت می‌شود [۱۲]. کاهش فعالیت آنزیم MTHFR در اثر تغییر نوکلئوتیدی (C677T) منجر به افزایش هموسیستئین می‌شود. هموسیستئین نقش حیاتی در متابولیسم اسیدآمینهای ضروری متیونین بازی می‌کند [۱۳]. از نظر بالینی پلی مورفیسم C677T در برخی موارد با افزایش خطر بیماری‌های قلبی و عروقی، نقص لوله‌ی عصبی، شکاف کام و لب، ترومبوز و اسکیزوفرنی در ارتباط است [۱۲]. هم‌چنین دارای اثر حفاظتی در برخی از سرطان‌ها از جمله Acute lymphoblastic Leukemia (ALL) و

سطوح HbA1C با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا سنجیده شد و هم‌چنین از فرمول-Cockcroft Gault برای تخمین^۵ GFR استفاده شده است.

DNA از نمونه‌ی خون کامل لوله‌های حاوی EDTA به روش فنل کلروفرم استخراج گردید و کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تکثیر ژن متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده توسط نرم‌افزار Gene Runner استفاده شده که توالی پرایمرهای مکمل و معکوس به ترتیب:

۵'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

و ۵'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که اجزای واکنش به ترتیب شامل: ۱۱/۳ میکرولیتر آب مقطر، ۶/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۷ میکرولیتر پرایمر مکمل، ۰/۷ میکرولیتر پرایمر معکوس و ۰/۸ میکرولیتر DNA الگو می‌باشد. واکنش PCR در ۳۵ سیکل انجام و مراحل دمایی واکنش شامل: دناتوراسیون اولیه ۹۵° سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل به این ترتیب انجام گرفت: مرحله‌ی دناتوراسیون ۹۵° سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال ۶۷° سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله‌ی تکثیر ۷۲° سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پس از آن مرحله‌ی تکثیر نهایی که در دمای ۷۲° سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. جهت تأیید محصولات PCR، قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده گردیدند و از نظر کیفیت محصول و عدم آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تعیین ژنوتیپ واریانت rs1801133 از روش هضم آنزیمی و یا RFLP^۸ استفاده شد. برش محصولات ژن متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز با آنزیم *Hinf-I* شرکت Thermo Fisher انجام شد. جهت واکنش هضم آنزیمی ۰/۱ میکرولیتر آنزیم *Hinf-I*، ۵/۲ میکرولیتر آب مقطر و ۱/۷ میکرولیتر بافر به ۱۰

سرطان کلورکتال می‌باشد [۱۲]. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C677T با نفروپاتی دیابتی می‌باشد.

روش‌ها

این مطالعه از نوع مورد - شاهد می‌باشد. افراد مورد مطالعه از مراجعه کنندگان به کلینیک دیابت دانشگاه علوم پزشکی تهران بوده که رضایت نامه‌ی کتبی، اطلاعات دموگرافیک و متغیرهای بالینی برای هر یک از افراد به دست آمده است. این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران تأیید شده است. این مطالعه شامل سه گروه افراد مبتلا به دیابت نوع دو با نفروپاتی (N=۱۰۴)، گروه مبتلا به دیابت نوع دو بدون نفروپاتی (N=۱۰۰) و گروه کنترل (N=۹۶) می‌باشد. افراد مبتلا به دیابت شامل افرادی با سابقه‌ی دیابت نوع دو بیش از پنج سال است. بیماران دیابتی با افزایش دفع آلبومین (آلبومین ادرار بیش از ۳۰ میلی‌گرم در ۲۴ ساعت و یا آلبومین/کراتینین بیش از ۳۰ mg/gr که با نمونه‌برداری مکرر در طی ۳-۶ ماه تأیید شده است) به عنوان بیمار دیابتی مبتلا به نفروپاتی در نظر گرفته شدند. بیماران با $HbA1c > 9\%$ ، عفونت مجاری ادراری، فشارخون بالای کنترل نشده، نارسایی قلبی، بارداری، عفونت‌های حاد سپتیک، مصرف سیگار، هماتوری و فعالیت ورزشی سنگین از مطالعه خارج گردیدند. پس از ۸ تا ۱۲ ساعت ناشتایی نمونه‌ی خون وریدی (با و بدون ضد انعقاد) و نمونه‌ی ادرار اول صبح جمع‌آوری شده و نمونه‌ی سرم پس از سانتریفیوژ جهت آنالیز بیوشیمیایی در دمای ۸۰°- سانتی‌گراد نگهداری شد. در هر سه گروه سطوح گلوکز خون، اوره، اوریک‌اسید، تری‌گلیسرید، کلسترول،^۲ (HDL-C)،^۳ (LDL-C)، کراتینین، نسبت آلبومین ادرار به کراتینین^۴ (ACR) با استفاده از کیت شرکت تجاری پارس آزمون مورد بررسی قرار گرفت.

⁵ Glomerular Filtration Rate

⁶ Forward Primer

⁷ Reverse Primer

⁸ Restriction Fragment Length Polymorphism

¹ Hemoglobin A1C

² High-density lipoprotein cholesterol

³ Low-density lipoprotein cholesterol

⁴ Albumin to Creatinine ratio

می‌کند. بین فراوانی ژنوتیپی گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی (TT+CT، ۳۷٪ در مقابل CC، ۶۷٪) و گروه دیابتی بدون نفروپاتی (TT+CT، ۵۱٪ در مقابل CC، ۴۹٪) از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($P \text{ Value} = 0/02$). تفاوت معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپی گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی با کنترل (TT+CT، ۴۷٪ در مقابل CC، ۴۹٪) وجود ندارد ($P \text{ Value} > 0/05$). از سوی دیگر میان فراوانی اللی در دو گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی (۲۱/۱٪) و دیابتی بدون نفروپاتی (۳۲٪) اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($OR: 1/754$ ، $CI: 1/123-2/740$ ، $P=0/013$). تفاوتی بین دو گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی و نرمال در فراوانی اللی وجود ندارد ($OR: 1/458$ ، $CI: 0/923-2/306$ ، $P=0/105$).

میکرولیتر محصول PCR اضافه و بر روی ترموبلاک با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفت. از ژل آگارز ۳ درصد برای بررسی محصولات حاصل از هضم آنزیمی استفاده شد در صورت وجود باز سیتوزین در ناحیه‌ی پلی مورفیسم C677T آنزیم *Hinf-1* جایگاه برش نداشته و قطعه‌ای به طول ۱۹۸ جفت باز دیده می‌شود. در صورتی که ژنوتیپ، هتروزیگوت باشد سه باند ایجاد می‌شود چرا که باز تیمین در جایگاه برش، ناحیه مورد نظر توسط آنزیم *Hinf-1* شناخته شده و برش می‌خورد و دو قطعه به طول ۱۷۵ و ۲۳ و یک قطعه به طول ۱۹۸ جفت باز به دلیل حضور باز سیتوزین ایجاد می‌کند. هنگامی که در جایگاه پلی مورفیسم دو باز تیمین قرار داشته باشند دو قطعه به طول ۱۷۵ و ۲۳ جفت باز دیده می‌شود. برای مقایسه‌ی فراوانی اللی و ژنوتیپی از آزمون کای اسکووار استفاده شد و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد. برای بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی و اطلاعات دموگرافیک از آزمون t-test استفاده شده است. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۴ انجام گرفت. جهت بررسی ارتباط میان پلی مورفیسم‌ها با نفروپاتی دیابتی از Odds Ratio با فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

یافته‌ها

متغیرهای بالینی و دموگرافیک در جدول ۱ نشان داده شده است. بین میزان اوره، HbA1C، کراتینین، HDL، ACR، GFR، فشار خون دیاستولیک و سابقه‌ی دیابت، دو گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی و دیابتی بدون نفروپاتی با در نظر گرفتن ($P < 0.05$) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. دو گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی و کنترل از نظر سن، قند خون ناشتا، HbA1C، اوره، کراتینین، کلسترول، HDL، LDL، ACR، وزن، نمایه‌ی توده‌ی بدنی، فشار خون سیستولیک و دیاستولیک دارای تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$). فراوانی ژنوتیپی در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی اللی و ژنوتیپی در هر سه گروه نفروپاتی، دیابت نوع دو و کنترل از تعادل هاردیواینبرگ پیروی

جدول ۱- متغیرهای بالینی و دموگرافیک

ویژگی‌ها	دیابتی بدون نفروپاتی (N=۱۰۰)	دیابتی مبتلا به نفروپاتی (N=۱۰۴)	کنترل (N=۹۶)
سن (years)	۵۷/۵±۸/۲	۶۲/۵±۹/۲ (a)	۵۰/۲±۱۰/۵
سابقه‌ی دیابت (years)	۱۰/۲±۶/۱	۱۳/۳±۷/۸ (b)	-
قد (Cm)	۱۶۵/۷±۹/۵	۱۶۵/۱±۱۰/۰	۱۶۳/۱±۸/۱
وزن (Kg)	۷۷/۹±۱۱/۶	۸۰/۷±۱۳/۳ (a)	۷۳/۲±۱۱/۵
نمایه‌ی توده‌ی بدنی (Kg/m ²)	۲۸/۵±۴/۲	۲۹/۶±۴/۹ (a)	۲۷/۵±۴/۲
فشار خون سیستولیک (mmHg)	۱۲۲/۸±۱۲/۴	۱۲۳/۷±۱۳/۷ (a)	۱۱۵/۴±۱۲/۹
فشار خون دیاستولیک (mmHg)	۷۸/۹±۶/۴	۷۵/۵±۹/۷ (a,b)	۷۹/۱±۶/۳
قند خون ناشتا (mg/dL)	۱۴۰/۲±۳۴/۷	۱۳۳/۸±۴۵/۹ (a)	۹۱/۷±۷/۸
هموگلوبین A1C (%)	۷/۱±۰/۷	۷/۴±۰/۷ (a,b)	۵/۵±۰/۵
اوره (mg/dL)	۳۶/۷±۱۳/۱	۴۲/۶±۱۶/۹ (a,b)	۲۹/۸±۷/۷
کراتینین (mg/dL)	۱/۱±۰/۲	۱/۳±۰/۵ (a,b)	۰/۹±۰/۲
اسید اوریک (mg/dL)	۵/۲±۱/۴	۵/۴±۱/۷	۴/۹±۲/۹
تری‌گلیسرید (mg/dL)	۱۴۸/۲±۸۱/۰	۱۴۵/۹±۷۵/۵	۱۳۵/۶±۶۸/۲
کلسترول (mg/dL)	۱۵۷/۴±۳۵/۲	۱۴۹/۱±۳۶/۷ (a)	۱۹۴/۰±۴۰/۴
HDLکلسترول- (mg/dL)	۴۶/۸±۹/۸	۴۳/۴±۱۰/۶ (a,b)	۵۱/۴±۱۲/۲
LDLکلسترول- (mg/dL)	۷۶/۳±۲۰/۱	۷۷/۲±۲۳/۶ (a)	۱۰۵/۴±۲۷/۲
ACR (μg/mg)	۲۴/۴±۵/۹	۲۴/۶/۶±۶۶/۵ (a,b)	۲۳/۱±۸/۳۱
میزان فیلتراسیون گلومرولی (L/min/1.73 m ²)	۷۶/۷±۲۰/۰	۶۴/۴±۲۹/۷ (b)	۷۶/۶±۲۹/۸

اعداد به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند.

HDL,High density lipoprotein; LDL,Low density lipoprotein-cholesterol;ACR,Albumin Creatinin Ratio

(P<0.05)=a تفاوت بین افراد دیابتی مبتلا به نفروپاتی و کنترل

(P<0.05)=b تفاوت بین افراد دیابتی مبتلا به نفروپاتی و دیابتی بدون نفروپاتی

در سه گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی، دیابتی بدون نفروپاتی و کنترل (rs1801133)جدول ۲- توزیع ژنوتیپی و اللی

ژنوتیپ	دیابتی مبتلا به نفروپاتی (تعداد- درصد فراوانی)	دیابتی بدون نفروپاتی (تعداد- درصد فراوانی)	گروه کنترل (تعداد- درصد فراوانی)
CC	۶۷ (/۶۴/۴)	۴۹ (/۴۹)	۴۹ (/۵۱/۰)
CT	۳۰ (/۲۸/۸)	۳۸ (/۳۸)	۴۰ (/۴۱/۶)
TT	۷ (/۶/۷)	۱۳ (/۱۳)	۷ (/۷/۳)
P Value		۰/۰۲	۰/۰۵
TT+CTvs.CC		OR:۰/۵	OR:۰/۵
الل		95% CI(۰/۳-۰/۹)	95% CI(۰/۳-۱/۰۱۵)
C	۱۶۴ (/۷۸/۸)	۱۳۶ (/۶۸)	۱۳۸ (/۷۱/۸)
T	۴۴ (/۲۱/۱)	۶۴ (/۳۲)	۵۴ (/۲۸/۱)
P Value		OR:(۱/۷۵۴)	OR:(۱/۴۵۸)
		95% CI(۱/۱۲۳-۲/۷۴۰)	95% CI(۰/۹۲۳-۲/۳۰۶)

P Value در دو گروه دیابتی بدون نفروپاتی و گروه کنترل با گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی مقایسه شده است.

بحث

آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز با تبدیل ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات ردکتاز (دهنده‌ی کربن در بیوسنتز نوکلئوتید) به متیلن تتراهیدروفولات (دهنده‌ی کربن در تبدیل هموسیستئین به متیونین) نقش اساسی در متابولیسم فولات بازی می‌کند. در مطالعات به نقص‌های خفیف و شدید این آنزیم و عوارض بالینی گسترده‌ی آن اشاره شده است [۱۴]. از نظر بالینی پلی‌مورفیسم C677T در برخی موارد با افزایش خطر بیماری‌های قلبی و عروقی، نقص لوله‌ی عصبی، شکاف کام و لب، ترومبوز و اسکیزوفرنی در ارتباط است [۱۲]. شیوع فرم هموزیگوت آن در سفیدپوستان (واریانت TT) ۱۲٪ و فرم هتروزیگوت آن (واریانت CT) بیش از ۴۰٪ می‌باشد. فرم هموزیگوت و تا حدی فرم هتروزیگوت آن با افزایش میزان هموسیستئین تام ارتباط دارد [۱۵]. در ایران تعدادی مطالعه بر روی ژن MTHFR در بیماری‌های مختلف انجام شده است، در مطالعه‌ی حاضر فراوانی پلی‌مورفیسم C677T با نفروپاتی دیابتی در سه گروه متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که میان توزیع ژنوتیپی دو گروه مبتلا به دیابت و نفروپاتی و گروه دیابتی بدون نفروپاتی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. برخلاف انتظار، فراوانی ژنوتیپ TT+CT و الل T در گروه دیابتی بدون نفروپاتی نسبت به گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی بالاتر می‌باشد.

در سال ۱۹۹۸ Neugebauer و همکاران ارتباط بین پلی‌مورفیسم C677T با نفروپاتی دیابتی را در بیماران مبتلا به دیابت غیر وابسته به انسولین در ژاپن بررسی کردند. نتایج مطالعه نشان داد که ۶۴٪ از بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی دارای الل جهش یافته (T) هستند این در حالی است که شیوع الل جهش یافته در گروه بیماران دیابتی بدون نفروپاتی ۳۶٪ بود [۱۶]. در روسیه ارتباط پلی‌مورفیسم C677T با دیابت نوع یک مورد بررسی قرار گرفت. تفاوتی بین توزیع ژنوتیپی گروه دیابتی و کنترل مشاهده نشد ($\chi^2 = 5.413, P > 0.05$). همچنین میزان فراوانی ژنوتیپ TT در افراد مبتلا به دیابت نوع یک و نفروپاتی (۰/۲۱۶) نسبت به افراد مبتلا به دیابت نوع

یک و بدون نفروپاتی (۰/۰۵۶) بالاتر بود [۱۷]. در مطالعه‌ی Rahimi و همکاران ارتباط بین پلی‌مورفیسم C677T با شروع و پیشرفت نفروپاتی دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو را در سه گروه مبتلا به ماکروآلبومینوری، دیابتی و میکروآلبومینوری و گروه شاهد مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که پلی‌مورفیسم C677T با شروع و پیشرفت نفروپاتی در افراد مبتلا به دیابت ارتباط دارد [۱۸]. در مطالعه‌ی در سال ۲۰۰۷ در تونس فراوانی الل T و همچنین ژنوتیپ $RR' = (2/39)CT$ و $RR = (8/28)TT$ در دو گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی و دیابتی بدون نفروپاتی نسبت به گروه کنترل بالاتر بود [۱۹]. نتایج حاصل از مطالعه‌ی در ترکیه بین دو گروه مبتلا به نفروپاتی و گروه مبتلا به دیابت نوع دو و بدون نفروپاتی نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپی در بیماران مبتلا به نفروپاتی و گروه کنترل وجود ندارد ($\chi^2 = 0/201, P\text{-value} > 0.05$). فراوانی الل T در گروه دیابتی مبتلا به نفروپاتی ۲۳/۴٪ و در افراد بدون نفروپاتی ۳۳/۰٪ بود [۲۰]. بررسی پلی‌مورفیسم C677T در دو گروه مبتلا به نفروپاتی و گروه مبتلا به دیابت نوع دو و بدون نفروپاتی و گروه کنترل در چین نشان می‌دهد که هیچ تفاوتی در توزیع ژنوتیپی بین دو گروه دیابتی و کنترل وجود ندارد ($\chi^2 = 3.85, P > 0.05$) [۲۱]. فراوانی ژنوتیپی MTHFR در افراد دیابتی مبتلا به نفروپاتی ($\chi^2 = 12.27, P < 0.005$) و بدون نفروپاتی دارای تفاوت آماری بود. فراوانی الل T در گروه نفروپاتی (۴۲/۳٪) نسبت به گروه دیابتی (۶/۲۸٪) معنی‌دار بود ($\chi^2 = 8.77, P < 0.005$) [۲۱].

در این مطالعه فراوانی ژنوتیپ TT و الل T در گروه دیابتی بدون نفروپاتی نسبت به گروه دیابتی با نفروپاتی بالاتر می‌باشد. به بیان دیگر مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که افراد دارای الل C مستعد ابتلا به نفروپاتی بوده و این در حالی است که الل T دارای اثر حفاظتی در ابتلا به این بیماری است. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که بین پلی‌مورفیسم C677T ژن MTHFR و نفروپاتی در بیماران مبتلا

¹ Relative risk, calculated according to Wolff's method

پلی مورفیسم C677T با نفروپاتی دیابتی در سایر مناطق جغرافیایی نیز مورد بررسی قرار بگیرد.

سپاسگزاری

در پایان از پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم بیمارستان شریعتی، اساتید و تمام کسانی که در اجرای این طرح همکاری کردند تشکر می‌نمایم.

به دیابت نوع دو ارتباط وجود دارد. از محدودیت‌های حاصل از این مطالعه می‌توان به عدم بررسی سطوح هموسیستئین در افراد مورد مطالعه و در دسترس نبودن متغیرهای بالینی و دموگرافیک تمام افراد شرکت کننده در مطالعه اشاره کرد. در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود که ارتباط ژنوتیپ‌ها با سطح هموسیستئین و همچنین مقادیر هموسیستئین در گروه‌ها مورد بررسی قرار گیرد. می‌توان پلی مورفیسم C677T را افراد مبتلا به دیابت نوع یک نیز مورد بررسی قرار داد. همچنین با توجه به تنوع نژادی در ایران پیشنهاد می‌شود که ارتباط بین

مآخذ

1. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical diabetes* 2008; 26(2):77-82.
2. Zimmet, P., K. Alberti, and J. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414(6865):782-787.
3. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, and Ezzati M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 2011; 378(9785):31-40.
4. Shaw JE, Sicree RA, and Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice* 2010; 87(1): p. 4-14.
5. Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu Fy, and Chen S. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annual review of pathology* 2011; 6:395.
6. Alwan A. Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2011: *World Health Organization*.
7. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, and Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1989; 320(18):1161-5.
8. Schena FP. and Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005; 16(3 suppl 1):S30-S33.
9. Scullion SMJ, Gurgul-Convey E, Elsner M, Lenzen S, Flatt PR, and McClenaghan NH. Enhancement of homocysteine toxicity to insulin-secreting BRIN-BD11 cells in combination with alloxan. *Journal of endocrinology*, 2012; 214(2):233-238.
10. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, and Van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. 1995.
11. Liew SC, and Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European journal of medical genetics* 2015; 58(1):1-10.
12. Bailey LB. *Folate in Health and Disease*. Second Edition. CRCNET books. 2009: CRC Press.
13. Carmel R, and Jacobsen DW. *Homocysteine in health and disease*. 2001; Cambridge University Press.
14. Rosenblatt DS. Inherited disorder of folate transport metabolism. *The metabolic and molecular bases of inherited disease* 1995; p. 3111-3128.
15. Bolander-Gouaille C. *Focus on Homocysteine and the Vitamins: Involved in its metabolism*. 2013: Springer Paris.
16. Neugebauer S, Baba T, and Watanabe T. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy in NIDDM patients. *The Lancet* 1998; 352(9126):454.
17. Shcherbak NS, Shutskeya ZV, Sheidina AM, Larionova VI, and Schwartz EI.

- Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms as a risk factor for diabetic nephropathy in IDDM patients. *Molecular genetics and metabolism* 1999; 68(3):375-378.
18. Rahimi M, Hasanvand A, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Mozafari H, Rezaei M, Zargooshi J, Najafi F, and Shakiba E. Synergistic effects of the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms on the increased risk of micro- and macro-albuminuria and progression of diabetic nephropathy among Iranians with type 2 diabetes mellitus. *Clinical biochemistry* 2010; 43(16):1333-1339.
 19. Mtriraoui N, Ezzidi I, Chaieb M, Marmouche H, Aouni Z, Chaieb A, Mahjoub T, Vaxillaire M, and Almawi WY. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and hyperhomocysteinemia as risk factors of diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients. *Diabetes research and clinical practice* 2007; 75(1):99-106.
 20. Eroglu Z, Erdogan M, Tetik A, Karadeniz M, Cetinalp S, Kosova B, Gunduz C, Ozgen AG, and Yilmaz C. The relationship of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism in Turkish type 2 diabetic patients with and without nephropathy. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2007; 23(8):621-624.
 21. Sun J, Xu Y, Zhu Y, and Lu H. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice* 2004; 64(3):185-190.

ASSOCIATION OF C677T MTHFR GENE POLYMORPHISM WITH DIABETIC NEPHROPATHY

Saeedeh Asgarbeik¹, Mahsa Mohammad Amoli^{2*}, Seyed Abdolhamid Angaji¹, Farideh Razi³, Ensieh Nasli-Esfahani³

1. Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Metabolic Disorders Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Diabetes Researcher Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: Diabetic Nephropathy is one of the main microvascular complications of diabetic mellitus. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) is one of the candidate genes of diabetic nephropathy. MTHFR (C677T) polymorphism reduces catalytic activity of MTHFR and leads to increase level of plasma homocysteine. The aim of this study was to evaluate the association of C677T polymorphism with diabetic nephropathy.

Methods: In this case control study, 300 individuals, including type 2 diabetes mellitus with diabetic nephropathy (N=104), diabetes mellitus patients without diabetic nephropathy (N=100) and controls (N=96) participated. The MTHFR genotype was determined using PCR-RFLP technique and biochemical parameters were measured.

Results: Genotype frequencies were significantly different between patients with diabetic nephropathy and diabetes mellitus without nephropathy (TT+CT vs CC; P=0.02, OR:0.5, CI:0.3-0.9). The allele frequency was also significantly different between diabetic nephropathy and diabetics mellitus without nephropathy (P=0.013, OR:1.754, CI:1.123-2.740).

Conclusion: These findings suggest that there is an association between C677T polymorphism and nephropathy in patients with type 2 diabetes. Allele C increase the risk of nephropathy, and T allele has a protective role in susceptibility to disease.

Keywords: Diabetic nephropathy, Methylenetetrahydrofolate reductase, Polymorphism, rs1801133

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