

## بررسی ارتباط بین پلی مرفیسم ژن اینترفرون گاما با دیابت نوع ۱ در بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم در نیم سال اول ۸۲

محمد حسین نیکنام<sup>\*</sup>، علی رفیعی نژاد<sup>۱</sup>، علی اکبر امیر زرگر<sup>۱</sup>، فریده خسروی<sup>۱</sup>، باقر لاریجانی<sup>۲</sup>.

### چکیده

**مقدمه:** دیابت نوع ۱ (T1 DM) بیماری خود ایمن مزمن و پیشرونده است که در اثر تخریب سلولهای بتای جزایر لانگرهانس با واسطه پاسخ های ایمنی پدید می آید. اتیولوژی دیابت نوع یک مانند دیگر بیماریهای خود ایمنی ناشناخته است و عوامل متعددی در بروز آن دخالت می کنند. هر دو نوع پاسخ ایمنی و هومورال و سلولی، در پاتوژنز بیماری نقش اساسی دارند. سیتوکاین ها به عنوان پپتیدهای ایمونومدولاتوری مسؤول بسیج سلول های ایمنی و تولید خودپادتن ها توسط سلولهای اجرایی هستند. برای ارزیابی نقش پلی مرفیسم ژنهای سیتوکاین ها در ایجاد حساسیت و یا مقاومت در برابر بیماری دیابت نوع ۱، ما IFN  $\gamma$  را انتخاب کردیم و همراهی پلی مرفیسم ژن آن را با T1DM بررسی کردیم.

**روشها:** در این بررسی ۳۰ بیمار مبتلا به T1DM و ۴۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. تکنیک PCR جهت تعیین پلی مرفیسم ژن IFN  $\gamma$  بکار گرفته شد. جدا سازی DNA بر اساس روش salting out انجام گرفت. ژن IFN  $\gamma$  در موقعیت UTR+5644<sup>5</sup> بررسی شد نتایج حاصل از PCR به کمک ژل الکتروفورز ارزیابی گردید.

**یافته ها:** حاصل مطالعه ما نشان می دهد که بین گروه بیمار و گروه شاهد ما اختلاف معنی داری در بروز آلل TT ژن IFN  $\gamma$  وجود دارد.  $p < 0.05$  و  $RR: 0.39 (0.22 < RR < 0.68)$  و از آنجا که  $OR < 1$  است، این رابطه از نوع منفی میباشد.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه ما یک رابطه منفی بین ژن IFN  $\gamma$  در موقعیت UTR+5644<sup>5</sup> و بیماری دیابت نوع ۱ در گروه مورد بررسی یافته ایم و از این جهت می توان تصور کرد که بروز آلل TT در ژن IFN  $\gamma$  می تواند از بروز دیابت جلوگیری کند

**کلید واژه ها:** دیابت نوع ۱، پلی مرفیسم ژن، سیتوکین ها

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- استاد بیماریهای غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\***نشانی:** تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

## مقدمه

دیابت قندی شامل دسته‌ای از اختلالات متابولیک است که در آن کمبود انسولین، مقاومت به انسولین و افزایش تولید گلوکز باعث هیپرگلیسمی و عوارض متعدد آن می‌شود. شیوع این بیماری در سطح دنیا رو به افزایش است و احتمالاً یکی از علل مهم بیماری (morbidity) و مرگ و میر باقی خواهد ماند. دو نوع اصلی آن، نوع ۱ و نوع ۲ است. در دیابت نوع ۱، عوامل ژنتیک، محیطی (مانند ویروس‌ها) و ایمونولوژیک باعث تخریب سلولهای بتای جزایر لانگرهانس پانکراس و کمبود مطلق انسولین می‌شوند [۱]. از عوامل ایمونولوژیک، ایجاد واکنش بیش‌حساسی تأخیری (delayed hypersensitivity) توسط سلولهای  $Th1^+$   $CD4+$  در برخورد با خودپادزاهای (autoantigens) سلولهای بتا، سیتوتوکسی سیتی توسط سلولهای  $CD8+$  و ترشح سیتوکین‌های التهاب‌زا و خودپادتن (autoantibody)‌ها را می‌توان نام برد [۲-۴]. سیتوکین‌های التهاب‌زا در مراحل ابتدایی بیماری و پیدایش عوارض شدید آن نقش کلیدی بازی می‌کنند. از جمله این سیتوکین‌ها، اینترفرون گاما ( $IFN-\gamma$ ) را می‌توان نام برد.

اینترفرون گاما گلیکوپروتئینی به وزن ۲۰ کیلودالتون است که ژن آن روی کروموزوم 12q14 واقع شده و دارای ۶ کیلو جفت باز است. این سیتوکین از سلولهای T و  $NK^2$  در پاسخ به تحریکات محیطی (نظیر ویروسها) ترشح شده و می‌تواند بر همه سلولها اثر بگذارد. از اعمال آن می‌توان تحریک ترشح ایمونوگلوبولین‌ها توسط سلولهای B، افزایش بیان  $MHC II^3$  بر سطح سلولها، افزایش اپسونیزاسیون در ماکروفاژها و قدرت کشندگی آنها و نیز تمایز سلولهای  $Th1$  در اثر تحریک ترشح IL-2 را می‌توان نام برد [۵].

ژن  $IFN-\gamma$  و به‌طور کلی ژن سیتوکین‌ها و گیرنده‌های آنها و در نتیجه توالی (sequence) اسیدهای آمینه آنها به‌ندرت دستخوش تغییرات (پلی مورفیسم) می‌شوند [۶،۷].

اغلب پلی مورفیسم‌های این ژنها در نواحی تنظیم کننده (ناحیه پروموتور، اینترون‌ها، 5' UTR & 3') اتفاق می‌افتند و می‌توانند در میزان ترشح سیتوکین‌ها و در نتیجه در روند بیماری و استعداد ابتلای شخص به بیماری اثر بگذارند [۹،۸]. ما در مطالعه خود، ارتباط بین پلی مورفیسم ژن سیتوکین  $IFN-\gamma$  و دیابت نوع ۱ را بررسی می‌کنیم.

## روشها

### بیماران

سی بیمار مبتلا به دیابت نوع یک (۱۶ مؤنث و ۱۴ مذکر) از مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم به طور تصادفی انتخاب شدند. مدت بیماری این افراد بین ۳ تا ۱۸ ماه بود. معیارهای ورود: کسانی که برای آنها توسط پزشک متخصص در درمانگاه مرکز تحقیقات طبق معیارهای NDDG<sup>4</sup> آمریکا تشخیص دیابت نوع ۱ گذاشته شده بود. معیارهای خروج: کسانی که مایل به ورود به طرح نبودند. ۴۰ نفر سالم (بدون علائم دیابت) به عنوان گروه شاهد به مطالعه ما وارد شدند.

### روش بررسی :

(۱) استخراج DNA: ۵ سی سی از خون بیماران با ضدانعقاد EDTA ترکیب شده و جهت استخراج DNA آن از روش salting out استفاده شد [۱۰].

(۲) Cytokine typing: برای این کار از روش PCR-SSP استفاده شد. دستگاه مورد استفاده 9600 PCR و کیت های آن PCR-SSP tray kit متعلق به دانشگاه هایدلبرگ آلمان بودند [۱۱].

مراحل PCR به ترتیب زیر انجام شدند:

دنا تورا سیون اولیه ۲ دقیقه در ۹۴ درجه؛ دنا تورا سیون ثانیه در ۹۴ درجه؛ آنیلینگ (Annealing) و اکستانسین (extension) ۱ دقیقه در ۶۵ درجه (۱۰ سیکل)؛ دنا تورا سیون (Denaturation) ۱۰ ثانیه در ۹۴ درجه؛ آنیلینگ ۵۰ ثانیه در ۶۱ درجه؛ اکستانسین ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه (۲۰ سیکل) (جدول یک).

<sup>1</sup> T helper cells

<sup>2</sup> Natural killer cells

<sup>3</sup> Major compatibility complex

<sup>4</sup> National Diabetes Data Group

موقعیت 5' UTR +5644 ژن IFN- $\gamma$  در گروه بیمار و شاهد به طریق شمارش ژنی مستقیم بررسی شد. یافته‌ها با استفاده از آزمون مجذورکای مقایسه شدند.

### یافته‌ها

فرکانس آل‌های A/T موقعیت 5'UTR +5644 ژن IFN- $\gamma$  در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ و گروه شاهد در جدول و شکل دو نشان داده شده است.

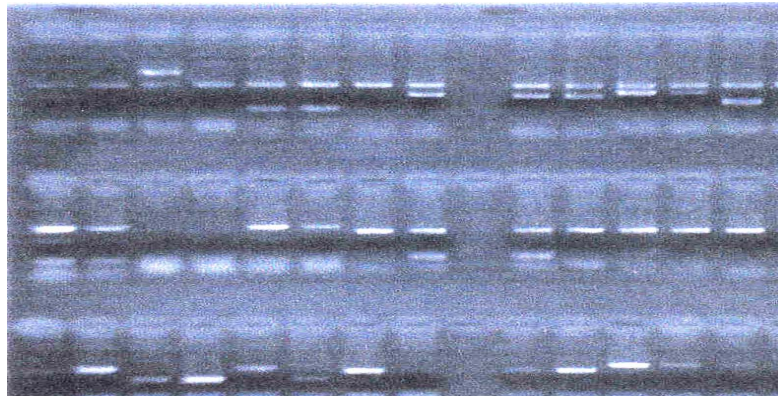
برای موقعیت مورد مطالعه، یک جفت پرایمرمختص آن موقعیت و یک جفت پرایمر شاهد که قسمتی از ژن بتا گلوبولین یا ژن CRP را تکثیر می‌کند، لازم بود [۱۱].

توالی پرایمرها به قرار زیر است:

forward(5'GACATTCACAATTGATTTTATTCTT AC-3')

reverse(5'GCCTTCCTGTAGGGTATTATTATAC-3')

برای مشاهده محصولات PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ انجام شد. بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل به دستگاه ترانس ایلومیناتور ماورای بنفش منتقل شد و عکس پولاوید تهیه شد (شکل ۱). فرکانس آل‌های



شکل ۱- شمای الکتروفورز محصولات PCR

جدول ۱- مراحل مختلف انجام آزمایش PCR

تعداد دور	مرحله	زمان	دما(درجه سلسیوس)*
cycle ۱	Initial denaturation	۱۲۰ ثانیه	۹۴
	Denaturation	۱۰ ثانیه	۹۴
cycle ۱۰	Annealing +extension	۶۰ ثانیه	۶۵
	Denaturation	۱۰ ثانیه	۹۴
	annealing	۵۰ ثانیه	۶۱
cycle ۲۰	extension	۳۰ ثانیه	۷۲

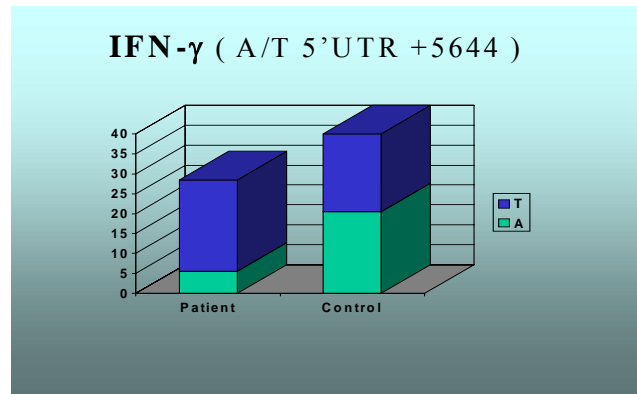
\* پس از انجام PCR نمونه‌ها تا زمان الکتروفورز باید در ۴+ سلسیوس نگهداری شوند

جدول ۲- فرکانس آل‌های A/T در موقعیت 5'UTR +5644 ژن اینترفرون گاما

شاهد	بیماران	IFN- $\gamma$ :5'UTR +5644
۴۱	۱۱	آدنین
۳۹	۴۶	تیمین

مجدور کای=۱۴/۴۳، مقدار P=۰/۰۰۱، خطر نسبی (relative risk)=۰/۳۹ (بین ۰/۲۲ و ۰/۶۸).

نسبت شانسی (odds ratio)=۰/۲۳ (بین ۰/۱ و ۰/۵۳)



شکل ۲- فرکانس آلل های A/T در موقعیت 5'UTR +5644 ژن اینترفرون گاما

می تواند مانع از پیدایش بیماری گردد . گزارش Siekiera [۱۸] با بررسی ما تطابق دارد و نشان می دهد که در کودکان مبتلا به دیابت نوع ۱، ژنگون TT به میزان کمتری دیده می شود . پوسیت (Pociot) [۱۹] که در بیماران دانمارکی، میکروساتلیت های IFN- $\gamma$  را بررسی کرده است، معتقد است که بین حضور این ژن ها و بیماری دیابت رابطه ای وجود ندارد. آواتا (Awata) [۲۰] در مقاله خود ژن اینترفرون گاما را یک نشانگر ژنتیکی خوب برای دیابت نوع ۱ معرفی نموده است.

با توجه به این اصل که ژن ها می توانند در ایجاد حساسیت یا مقاومت به یک بیماری خاص مؤثر باشند، حضور یک ژنوتیپ خاص از یک سیتوکین نیز می تواند در جهت یکی از این دو حالت ذکر شده نقش داشته باشد؛ همچنان که حضور ژن HLA DR3 سبب حساسیت به بیماری دیابت و ژن HLA DR2 باعث مقاومت به آن می شوند. ژنگون TT سیتوکین اینترفرون گاما احتمالاً قادر است از پیدایش بیماری ممانعت نماید.

مطالعه در گروه های بزرگتر و بین فامیلی می تواند به تأیید این نظریه کمک نماید و در نتیجه امکان بررسی افراد مستعد یا مقاوم در خانواده مبتلایان و درمانهای پیشگیرانه را فراهم کند.

در این مطالعه ملاحظه می کنیم ارتباط معنی داری بین دو گروه بیمار و شاهد وجود دارد. به عبارتی، ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ TT در موقعیت 5' UTR +5644 IFN- $\gamma$  و بیماری دیابت نوع ۱ وجود دارد و با توجه به نسبت شانزده کوچکتر از ۱ ( $OR < 1$ ) این ارتباط از نوع منفی (negative association) است یعنی داشتن این ژنوتیپ می تواند نقش محافظت کننده در برابر ابتلا به دیابت نوع ۱ داشته باشد.

## بحث

در این مطالعه پلی مورفیسم ژن سیتوکین اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ بررسی شده است. نقش سیتوکین ها در آسیب زایی (pathogenesis) دیابت نوع ۱ در تحقیقات زیادی نشان داده شده است [۱۳، ۱۲]. IFN- $\gamma$  یک سیتوکین ایمنومودولاتور است که بر روی کارکرد دستگاه ایمنی اثر فراوانی دارد و در موارد التهاب میزان ترشح آن افزایش می یابد [۱۴]. پلی مورفیسم ژن این سیتوکین می تواند در میزان ترشح آن و روند بیماری اثر بگذارد. پلی مورفیسم های متعددی برای این ژن کشف شده اند [۱۵-۱۷]. نتایج بررسی ما روی موقعیت 5'UTR+5644 سیتوکین IFN- $\gamma$  نشان می دهد که ژنگون TT با بیماری دیابت نوع ۱، دارای رابطه منفی است و در نتیجه احتمالاً

## مآخذ

1. Powers AC .Diabetes Mellitus ; in: (*Harisons' principles of Internal Medicine* edited by Eugene Braunwald, 15<sup>th</sup> edition .McGraw-Hill publisher New york ; 2001, PP 2109-2137.

2. Yazdchi L, Rafiei S. Oral administration of E.coli GAD has immunomodulatory effects in diabetes. *Microbes* 2000; 102: 326-59.
3. Gottlieb PA, Eisenbrth GS. Human autoimmune diabetes In: *The Molecular Pathology of Autoimmune Disease*. Theopilopoulous. Tylor & Francis Publishing; 2002. p 588-613.
4. Abbas AK. *Celluar and Molecular immunology*. 10th edition Saunders publisher philadelphia 2003 , PP:243-273.
5. Sundy JS. Patel DD. Cytokines in normal and pathogenic inflammatory responses. In (Inflammation) edited by Gallin JI. Lippincott Williams & Wilkins publisher. Philadelphia 1999. p 433-41.
6. Kevan C. Sarne H. *Autoimmune Endocrine Disorders*. In: Autoimmune disease, edited by Lahita RG. Lippincott publishing; 2000.p 391-401.
7. Bidwell J. Keen L . Cytokine gene polymorphism in human disease supplement 1. *Genes and Immunity* 2001; 2: 61-70.
8. Chevillard C. Henri S. Two new polymorphisms in the human IFN- $\gamma$ . promoter region. *European Journal of Immunology* 2002; 3: 165-9.
9. Lio D. Marino V. Genotype frequencies of the +874 (T ---> A ) single nucleotide polymorphism in the first intron og the IFNgamma gene is sample of Sicillian patients affected by tuberculosis. *J. Immun. genet.* 2002; 29:371-4.
10. Miller SA. Dykes D. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells .*Nucleic Acids Research* 88;16:1215.
11. Uboldi de Capei M. Dametto E. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *European Journal of Immunogenetics* 2003; 30: 5-10.
12. Konenkov VI., Prokofiev VF. Polymorphism of immune response genes as a factor for predisposition to development of diseases. *Russian journal of immunology* 2001; 6: 124-130.
13. Akalin E. Murph B. Gene polymorphism and Transplantation . *Curr. Opinion in immun* 2001 , 13:572-576.
14. Provica V. Perry C. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFNgamma gene, absoute correlation with a polymorphic CA micro-satellite marker of high IFN gamma production . *Human immun.* 2000;6:863-6.
15. Henri S. Stefani F. Description of three new polymorphism in the intron and 3'UTR region of the human IFNgamma gene. *Genes Immu* 2002; 3: 1-4.
16. Iwasaki H. Ota N. Five novel SNP polymorphisms of human IFNgamma, identified by sequencing the entire gene. *Human Genetics* 2001; 46: 32-4.
17. Bream JH. Ping A. A single Nucleotide polymorphism in the proximal IFN gamma promoter region alters control of gene transcription. *Genes Immunology* 2002; 3: 165-9.
18. Siekiera U. Jorosz-chobat p. Polymorphisms of TNF $\alpha$ , IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$  genetically conditioned synthesis in children with T1DM. *Endokrynol Diabetiol Chor. Przemiaru Wieku Rozw* 2002; 8: 29-34.
19. Pociot F. Veijola R. Analysis of IFN- $\gamma$  gene polymorphism in Danish & Finish IDDM patients and control subjects. *J. Interferon Cytokine Res.* 1997; 17:87-93.
20. Awata T. Matsuma C. Association of polymorphisms of IFN gamma with IDDM . *Diabetologia* 1994; 37: 1159-62.