

## مطالعه پلی مرفیسم کدون ۲۵ ژن TGFβ در بیماران مبتلا به دیابت تیپ I

دکتر مهتاب مسعود\* - دکتر عیسی صالحی\*\* - دکتر نوشین شیخ بهایی\*\* - دکتر اسدالله رجب\*\*\* - دکتر محمد وجگانی\*\*\*\*

دکتر احمد مسعود\*\*\*\*

\*پزشک عمومی

\*\* دانشجوی دوره Ph.D ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\* متخصص غدد، انجمن دیابت ایران

\*\*\*\* استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۸۶/۳/۲۹

### چکیده

مقدمه: دیابت تیپ I یکی از بیماری‌های خودایمن است که با تخریب سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس همراه است و بیشتر افراد را، در نوجوانی و جوانی مبتلا می‌کند. زمینه‌های ژنتیکی، محیطی و نیز ایمونولوژی در ایجاد و پیدایش عوارض مختلف این بیماری نقش دارند. TGFβ یکی از سیتوکین‌هایی است که در تنظیم و مهار پاسخ‌های ایمنی نقش دارد و ترشح غیرطبیعی آن در بیماری‌های خودایمنی دیده می‌شود. پلی مرفیسم ناحیه ۹۱۵ ژن TGFβ، تولید و ترشح این سیتوکین را تحت تاثیر قرار می‌دهد و به عنوان عامل خطر در بیماری‌های خودایمنی قلمداد می‌شود.

هدف: مقایسه پلی مرفیسم کدون ۲۵ ژن TGFβ در بیماران با گروه شاهد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع مورد - شاهدهی بود و ۷۵ بیمار دچار دیابت تیپ I که تشخیص آنها حداقل ۲ سال پیش از نمونه‌گیری توسط پزشک متخصص قطعی شده و با انسولین درمان می‌شدند و گروه کنترل از داوطلبان اهدای خون که به سازمان انتقال خون ایران مراجعه کرده بودند پس از اخذ رضایت انتخاب شدند.

از نرم افزار SPSS برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و از آزمون آماری مربع کای با حدود اطمینان ۹۵٪ برای مقایسه نتایج استفاده شد.

نتایج: تفاوت آماری معنی‌داری در پلی مرفیسم C/G در ناحیه ۹۱۵ بین بیماران و گروه شاهد وجود نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: اگر چه پلی مرفیسم ناحیه ۹۱۵ ژن TGF-β تولید این سیتوکین را تحت تاثیر قرار می‌دهد و این سیتوکین در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش اساسی دارد، اما وجود نوکلئوتیدهای C یا G در جایگاه ۹۱۵ کدون ۲۵ نمی‌تواند به عنوان فاکتور خطر یا مستعد کننده در بروز بیماری دیابت در نظر گرفته شود.

**کلید واژه ها:** دیابت شیرین وابسته به انسولین / فاکتور رشد متغیر بتا / نوکلئوتیدها

### مقدمه

زیادی را به جامعه تحمیل می‌کند (۳). در بررسی‌های مختلف، اختلال سیتوکین‌ها و به هم خوردگی تعادل شبکه‌ی سیتوکینی در پاتوژنز مؤثر شناخته شده است. غالب محققان بر این عقیده‌اند که تبدیل لنفوسیت‌های Th1 به Th2 که الگوی ترشح سیتوکینی خاصی دارد، موجب فعال شدن لنفوسیت‌های اتوراکتیو شده و باعث تهاجم آنها به پانکراس و در نهایت تخریب سلول‌های بتای آن می‌شود (۷-۴).

دیابت تیپ I یکی از بیماری‌های خود ایمن رو به افزایش است که با تخریب سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده و از دست دادن مادام‌العمر توانایی تولید انسولین مشخص می‌شود (۱ و ۲). زمینه ژنتیک و عوامل محیطی در بروز این بیماری نقش مهمی دارند و بیماری غالباً در سن پایین بروز می‌کند. وابستگی مطلق بیماران به درمان‌های طولانی مدت و عوارض ناشی از بیماری، هزینه‌های انسانی و اقتصادی

نویسنده مسئول: دکتر مهتاب مسعود؛ تهران - خیابان انقلاب - خیابان پورسینا - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - گروه ایمونولوژی ۱

massoud\_ah\_2002@yahoo.com

خون ایران انتخاب شدند و پس از معاینه پزشک سازمان و گرفتن رضایت، برای شرکت در طرح تحقیقاتی، از آنان نمونه‌گیری انجام شد.

۵ میلی‌لیتر خون کامل از افراد بیمار و سالم گرفته شد. نمونه‌ها با EDTA مخلوط شد و تا خاتمه نمونه‌گیری و انجام آزمایش در فریزر ۷۰- نگهداری شدند.

DNA به روش استاندارد (۹) از خون‌های کامل استخراج و کیفیت آن براساس OD260/OD280 بررسی شد که در تمام آنها این نسبت بین ۱/۷-۱/۹ بود.

برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در موقعیت +۹۱۵ ژن TGFβ به روش PCR-SSP، از پرایمری با توالی CGAGCCGCAGCTTGGACAGGAT به عنوان

common reverse و دو پرایمر forward با توالی‌های ACTGGTGCTGACGCCTGTCCG و

ACTGGTGCTGACGCCTGTCCG در لوله‌های مجزا استفاده شد (۹ و ۱۰).

برنامه PCR برای تکثیر قطعه ۱۱۶ جفت بازی توسط دستگاه Master cycler (ependorf Germany) به این شرح بود:

۹۵ درجه	۲ دقیقه	۱ بار
۹۵ درجه	۲۰ ثانیه	
۷۲ درجه	۱ دقیقه	۵ بار
۹۵ درجه	۲۰ ثانیه	
۶۷ درجه	۲۰ ثانیه	
۷۲ درجه	۴۰ ثانیه	۲۵ بار
۷۲ درجه	۵ دقیقه	۱ بار

فرآورده‌های واکنش PCR با ژل آگارز ۲٪ و برومید اتیدیوم و ترانس ایلومیناتور بررسی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و آزمون مربع کای با

جابجایی نوکلئوتیدها در نواحی تنظیم‌کننده ژن‌های سیتوکین (پلی مرفیسم) تأثیر زیادی بر میزان ترشح سیتوکین‌ها دارد و از طرفی حضور آل‌های متفاوت ژن‌های سیتوکین‌های مختلف بر تعادل نهایی شبکه سیتوکینی مؤثر است (۷ و ۶).

TGFβ سیتوکینی است که بر تکثیر و تمایز سلول‌ها و تولید ماتریکس اثر دارد و با تأثیر بر ترشح سیتوکین‌های دیگر موجب تنظیم و عمدتاً مهار پاسخ‌های ایمنی می‌شود. ژن TGFβ در انسان بر روی کروموزوم ۱۹ و در جایگاه q13 قرار گرفته و از ۷ اگزون تشکیل شده که پروتئین پیش‌ساز ۳۹۰ آمینواسید را می‌سازد. حدود ۸ پلی‌مرف از TGFβ شناسایی شده که پلی‌مرفیسم G/C در جایگاه +۹۱۵ یکی از آنهاست. پلی‌مرفیسم ژن TGFβ با تأثیر بر اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری، تولید، ترشح و فعالیت آن را متأثر می‌کند یعنی در ناحیه +۹۱۵ کدون ۲۵، عمدتاً بر میزان تولید این سیتوکین تأثیر می‌گذارد. تأثیر TGFβ بر تنظیم شبکه سیتوکینی و پاسخ‌های ایمنی در بررسی‌های قبلی ثابت شده است.

در این مطالعه، پلی‌مرفیسم ناحیه +۹۱۵ ژن TGFβ در بیماران دچار دیابت تیپ I مورد بررسی قرار گرفت (۲، ۴، ۷ و ۸).

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی با همکاری انجمن دیابت ایران، ۷۵ بیمار دچار دیابت تیپ I که حداقل ۲ سال از تشخیص قطعی بیماری آنان توسط پزشک متخصص غدد درون‌ریز گذشته بود که درمان نیز می‌شدند، شناسایی و پس از اخذ رضایت برای نمونه‌گیری انتخاب شدند.

گروه شاهد از اهداکنندگان سالم خون به سازمان انتقال

حدود اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

بررسی‌های گوناگونی انجام داده‌اند (۴) که در این میان TGF-β از مهم‌ترین سیتوکین‌هایی است که لنفوسیت‌های Th تولید می‌کنند (۱۱). حدود ۲۰ نوع موجود TGF-β بررسی شده است (۲). برخی از پلی‌مرف‌های آن در اتیولوژی دیابت تیپ I و برخی دیگر در بروز عوارض متعدد آن مثل عوارض کلیوی، قلبی، چشمی و عصبی نقش دارند (۱۵-۱۲).

TGF-β کدون‌های متعددی دارد. پلی‌مرفیسم در برخی کدون‌ها با جنبه‌های مختلف دیابت ارتباط دارد. مطالعه همزمان پلی‌مرفیسم کدون‌های مختلف اطلاعات جامع‌تری به دست می‌دهد اما این کار به دلیل هزینه گزاف و امکانات محدود عملی نیست. لذا بسته به مورد، کدون یا کدون‌های خاصی را بررسی می‌کنند.

مقایسه نتایج در گروه‌های بیمار شاهد نشان داد که آلل‌های متفاوت در کدون ۲۵ نقشی در بروز دیابت تیپ I ندارد، اما در مطالعه Patel و همکاران بر کدون‌های ۱۰، ۲۵ و ۲۳۶ نشان داده شد که کدون ۱۰ نقش قابل ملاحظه‌ای در ایجاد نفروپاتی ناشی از دیابت دارد در حالی که در پلی‌مرفیسم کدون‌های ۲۵ و ۲۶۳ اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به افراد سالم بدست نیامد (۹).

محققان مختلف در بررسی‌های خود ارتباط بین کدون ۲۵ و افزایش فشار خون را نشان داده‌اند و اخیراً نیز Branek و همکاران در دیابت نوع I ارتباط رتینوپاتی و کدون ۲۵ را بدست آورده‌اند، اما هیچ ارتباطی بین کدون ۲۵ و نفروپاتی دیده نشد (۱۶). برخی بررسی‌ها نقش TGF-β را در بروز عوارض فیروتیک ریه نشان داده‌است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که برخی از کدون‌های TGF-β نقش مهمی در ایجاد عوارض ناشی از دیابت نوع I به عهده دارند (۲۱-۱۷). در مطالعه ما ۸۹/۲٪ بیماران فرم GG، ۸٪ فرم GC و ۲/۶٪ فرم CC را در کدون ۲۵ نوکلئوتید +۹۱۵ نشان دادند که از نظر

## نتایج

ویژگی‌های دموگرافی گروه بیمار و شاهد در جدول ۱ نشان داده شده‌است. برای بررسی بیشتر بیماران، مبادرت به اندازه‌گیری مقدار Hb A1c نمودیم که در زنان ۶/۴٪ و در مردان ۶/۷٪ بدست آمد.

در جدول ۲ توزیع ژنوتیپ TGFβ در نوکلئوتید +۹۱۵ در کدون ۲۵ آورده شده‌است. مقایسه نتایج با آزمون آماری مربع کای در گروه شاهد و بیمار نشان داد که تفاوت معنی‌داری در نحوه توزیع ژنوتیپ‌های مختلف بین دو گروه وجود ندارد.

جدول ۱: مشخصات افراد مورد مطالعه در دو گروه بیمار (دیابتی)

و شاهد (سالم)

متغیرها	گروه‌ها	
	بیمار (دیابتی) n=۷۵	شاهد (سالم) n=۸۸
جنس	مرد (درصد)	تعداد (درصد)
	۳۲ (۴۲/۷)	۵۰ (۵۶/۸)
	زن (درصد)	تعداد (درصد)
	۴۳ (۵۷/۳)	۳۸ (۴۳/۲)
میانگین سنی (سال)	۱۵	۲۰
میانگین سن شروع بیماری (سال)	۷/۳	-
میانگین زمان ابتلا به بیماری (سال)	۹/۹	-

جدول ۲: توزیع ژنوتیپ جایگاه +۹۱۵ کدون ۲۵ ژن TGFβ<sub>1</sub> در

افراد دیابتی و سالم

P Value	ژنوتیپ	گروه‌ها	
		بیمار (تعداد) (درصد)	سالم (تعداد) (درصد)
> ۰/۰۵	GG	۶۶ (۸۹/۴)	۸۰ (۹۱)
> ۰/۰۵	GC	۶ (۸)	۶ (۶/۶)
> ۰/۰۵	CC	۳ (۴/۶)	۲ (۲/۴)

## بحث و نتیجه گیری

دیابت نوع I خودایمن است که در آن لنفوسیت‌های Th1 و Th2 نقش مهمی ایفا می‌کنند (۲). محققان مختلف درباره نقش سیتوکین‌های متعدد در دیابت نوع I

قلمدادشود. احتمال دارد تحقیقات بعدی بتواند نقش کدون ۲۵ و کدون‌های دیگر را در بیماری‌زایی و ایجاد عوارض متعدد در این بیماران نشان دهد. تشکر و قدردانی: این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده‌است و انجمن دیابت ایران و سازمان انتقال خون ایران مساعدت فراوانی در نمونه‌گیری مبذول نموده‌اند که بدین‌وسیله کمال تشکر به‌عمل می‌آید.

آماري با افراد سالم اختلاف معنی‌دار نداشت (p value>۰/۰۵). از طرف دیگر بررسی ما ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مرفیسم کدون ۲۵ ژن TGF-β و HbA1c چه در زنان و چه در مردان نشان نداد. به عبارت دیگر از نظر آماری بین افزایش یا کاهش HbA1c و TGF-β ارتباط معنی‌دار دیده‌نمی‌شود (p value>۰/۰۵) لذا پلی‌مرفیسم در ناحیه +۹۱۵ کدون ۲۵ ژن TGF-β نمی‌تواند عامل خطر یا متغیر پیش‌گویی‌کننده در بروز دیابت تیپ I

### منابع

- Vence MDL, Benoist C. beta-Cell Death During Progression to Diabetes. *Nature* 2001; 414(6865): 792-8.
- Gregg RK, et al. A Sudden Decline in Active Membrane-bound TGF-Beta Impairs Both T Regulatory Cell Function and Protection against Autoimmune Diabetes. *J Immunol* 2004; 173(12): 7308-16.
- Mukherjee R, et al. Regulation of Type 1 Diabetes by a Self-MHC Class II Peptide: Role of Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003; 49(2): 159-69.
- Bidwell J, et al. Cytokine Gene Polymorphism in Human disease: On-Line Databases, Supplement 1. *Genes Immun* 2001; 2(2): 61-70.
- Eerligh, P, et al. Functional Genetic Polymorphisms in Cytokines and Metabolic Genes as Additional Genetic Markers for Susceptibility to Develop Type 1 Diabetes. *Genes Immun* 2004; 5(1): 36-40.
- Haukim N, et al. Cytokine Gene Polymorphism in Human Disease: On-Line Databases, Supplement 2. *Genes Immun* 2002; 3(6): 313-30.
- Kallmann B A, et al. Cytokine Secretion Patterns in Twins Discordant for Type 1 Diabetes. *Diabetologia* 1999; 42(9): 1080-5.
- Atilla G, et al. TGF-Beta1 Gene Polymorphisms in Periodontal Diseases. *Clin Biochem* 2006; 39(3): 929-34.
- Patel A, et al. The TGF-Beta 1 Gene Codon 10 Polymorphism Contributes to the Genetic Predisposition to Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabet Med* 2005; 22(1): 69-73.
- Du W, et al. TGF-Beta Signaling is Required for the Function of Insulin-Reactive T Regulatory Cells. *J Clin Invest* 2006; 116(5): 1360-70.
- Santilli CFF, Mohn A. Role of Growth Factors in the Development of Diabetic Complications. *Horm Res* 2000; 53(2): 53-67.
- Flores L, et al. Transforming Growth Factor Beta at Clinical Onset of Type 1 Diabetes Mellitus. A Pilot Study. *Diabet Med* 2004; 21(8): 818-22.
- Ziyadeh FN, Sharma K. Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Glomerulosclerosis and Renal Hypertrophy. *Kidney Int Suppl* 1995; 51: S34-6.
- Huang C, et al. Cellular Basis of Diabetic Nephropathy: II. The Transforming Growth Factor-Beta System and Diabetic Nephropathy Lesions in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2002; 51(12): 3577-81.
- Hellmich B, et al. Activation of Transforming Growth Factor-Beta1 in Diabetic Kidney Disease. *Metabolism* 2000; 49(3): 353-9.
- Beranek M, et al. Polymorphism R25P in The Gene Encoding Transforming Growth Factor-Beta (TGF-beta1) is A Newly Identified Risk Factor for Proliferative Diabetic Retinopathy. *Am J Med Genet* 2002; 109(4): 278-83.
- Kang MJ, et al. Effects of Diabetes and Hypertension on Glomerular Transforming Growth Factor-Beta Receptor Expression. *Kidney Int* 2000; 58(4): 1677-85.
- Border WA, Noble NA. Evidence that TGF-Beta Should be a Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy. *Kidney Int* 1998; 54(4): 1390-1.

19.Tsiavou, A, et al. TNF-Alpha, TGF-Beta1, IL-10, IL-6, Gene Polymorphisms in Latent Autoimmune Diabetes of Adults (LADA) and Type 2 Diabetes Mellitus. J Clin Immunol, 2004. 24(6):591-9.

20.Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and Their Roles in Pancreatic Islet Beta-Cell

Destruction and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Biochem Pharmacol 1998; 56(8 ): 1139-49.

21.Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, Stress, and Diabetes. J Clin Invest 2005 115(5): 1111-9.

## Survey the Single Nucleotide Polymorphism of TGFβ at Codon 25 in Type 1 Diabetic Patients

Masood M.(MD), Salehi I.(Ph.D), Sheykh Bahayi N.(Ph.D), Vojgani M.(Ph.D), Rajab A.A.(MD),  
Massoud A.(Ph.D)

### Abstract

**Introduction:** Type 1 diabetes is an autoimmune disease which is characterized by T-cell mediated destruction of pancreatic β-cells. A variety of environmental and genetic factors are involved in the development of the disease.

Transforming Growth Factor Beta-1 (TGFβ) is a multifunctional cytokine that affected regulation and difference of immune responses and there is abnormal secretion of this auto immune disease.

Genetic polymorphisms in the TGFβ gene influenced production and secretion of cytokine and figured as a risk factor in auto immune disease.

**Objective:** In this study, single nucleotide polymorphism of TGFβ at codon 25s investigated in type 1 diabetic patients and compared with healthy controls.

**Materials and Methods:** This was a case control study which 75 type 1 diabetic patients who had definitely diagnosed at least 2 years before sampling and were under Insulin therapy were selected. Control group were selected from voluntarily blood donors who had referred to IRAN Blood Transfusion Organization.

Data were analyzed by SPSS and using chi- square test with 95% confidence interval.

**Results:** The findings showed that there were not statistically significant differences in G C polymorphism at +915 between cases and control groups (p value 0.05).

**Conclusion** Although TGFβ polymorphism at +915 regions affects the production of cytokine regulates immune responses; this study showed that single nucleotide polymorphism in this region can not be involved in onset of type 1 diabetes and can not be considered as risk factor.

**Key words:** Diabetes Mellitus, Insulin- Dependent/ Nucleotides/ Transforming Growth Factor Beta