مجله دیابت و لیپیدایران، تابستان ۱۳۸۷؛ دوره ۷ (شماره ٤) ٤٢٩-٤٢٥

گزارش کوتاه

بانک DNA و سرم بیماران دیابتی ایران برای مطالعات اپیدمیولوژیک

سمیه امینی[۱]، پروین امیری[۱]، باقر لاریجانی[۱]، مهسا محمدآملی*[۱]

چکیده

جهت پیشگیری از صرف وقت و هزینه برای جمع آوری نمونه در طرح های تحقیقاتی ,بانک‌های DNA و سرم در نقاط مختلف دنیا تشکیل شده است که راه اندازی بانک DNA و سرم بیماران دیابتی در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران نیز در این راستا می باشد. لذا گزارشی از مراحل مختلف تشکیل این بانک در این مقاله ارائه می‌گردد.

پس از بررسی و مطالعه بر روی بانک‌های DNA در سراسر دنیا، مراحل ذیل جهت تکنیک‌های قابل استفاده در ایران و بهینه سازی روش‌ها، با توجه به شرایط موجود مورد ارزیابی قرار گرفت :

۱- Sampling ,Handling (کلیه مراحلی که قبل از ذخیره‌سازی نمونه، طی می‌شود)، ۲ – Barcoding and Labeling ،۳ – Storage : ذخیره‌سازی نمونه‌ها و٤ – Validation :که با انجام یک مطالعه مقدماتی در درمانگاه دیابت، اعتبار طرح سنجیده می‌شود.

از جمله اهداف مورد نظر در بانک‌های مختلف دنیا، در مرحله نخست, جمع آوری نمونه های متعدد با صرف هزینه کمتر, مطالعه بر روی عوامل ژنتیکی و نیز تعیین ارتباط بین یافته های بالینی و مطالعات ژنتیکی بیماران و در مرحله بعد , تبادل اطلاعات در سطوح ملی و بین الملل است که با راه اندازی بانک DNA و سرم بیماران دیابتی در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان دکتر شریعتی، دستیابی به این اهداف میسر می گردد.

واژگان کلیدی: بانک DNA , دیابت, ایران

۱- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی*** :تهران , خیابان کارگر شمالی,بیمارستان دکتر شریعتی,طبقه پنجم,کد پستی ١٤١١٤؛تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷ -۰۲۱
نمابر:۸۸۲۲۰۰۵۲ -۰۲۱ ؛پست الکترونیک :emrc@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۷
تاریخ پذیرش: ۸۷/٦/۱۵

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بانک DNA مکانی جهت ذخیره DNA به منظور انجام کارهای تحقیقاتی و یا بررسی‌های قانونی است[۱]. از آنجا که در انجام مطالعات پژوهشی، بدلیل عدم بکارگیری سیستم کدگذاری و ذخیره‌سازی مناسب , نمونه‌های جمع‌آوری‌شده ، جهت تحقیقات بعدی قابل استفاده مجدد نمی‌باشند؛ لذا ناگزیر از صرف وقت و هزینه بسیار در هر طرح تحقیقاتی بمنظور انجام نمونه‌گیری و جداسازی سرم یا DNA بیماران هستیم [۳و۲] که این امر سبب ایجاد محدودیت‌هایی در راستای اجرای طرح‌های تحقیقاتی می‌گردد.جهت پیشگیری از این موانع, بانک‌های متعددی در نقاط مختلف تشکیل شده که نمونه آن بانک سرم نروژ با حدود ۵۰۰۰۰۰ نمونه می‌باشد که هدف آن بررسی شیمیایی، بیوشیمیایی و ایمونولوژیک سرم بیماران است که ممکن است نشاندهنده پیشرفت کانسرها در مراحل ابتدایی باشد[٤]. نمونه دیگر, بیوبانک ژاپن است که با هدف بررسی ارتباط علایم کلینیکی با اطلاعات ژنتیکی، در راستای ارائه اطلاعات مفید در مورد مصرف داروهای جدید و نیز مقدار مصرف آن راه‌اندازی شده است [۵]. همچنین در بانک DNA استرالیا، فعالیت‌هایی به منظور ذخیره‌سازی DNA بیماران شرکت کننده در طرح‌های تحقیقاتی به منظور انجام انواع بررسی‌های ژنتیکی انجام می گیرد[٦]. بانک DNA در جزیره Sao Miguel در پرتغال، با هدف بررسی زمینه ژنتیکی افراد ساکن در منطقه و نیز تشخیص پلی‌مورفیسم‌ها تأسیس شده است[۷]. در دانشگاه Northwestern در شیکاگو نیز بانک DNA جهت شناسایی نقش ژن‌ها در بیماری‌های شایع و نیز نقش آنها در بروز متفاوت یک بیماری در افراد مختلف تدوین شد [۸].Kids heart DNA Bank، بانک دیگریست که به منظور بررسی ژنتیکی کودکان مبتلا به بیماری‌های مادرزادی قلب (به ویژه علل آن) راه‌اندازی شده است[۹]. در ایران بانک‌های DNA با مقاصد گوناگون گردآوری شده‌اند. به عنوان مثال :

۱) Iranian human mutation gene bank که با هدف پیشگیری از بیماری‌های وراثتی (مانند تالاسمی، افت شنوایی، ناباروری مردان و ...) به بررسی DNA بیماران مبتلا و افراد درجه اول خانواده آنها می‌پردازد [۱۰].

۲) Primary immune deficiency disease DNA Bank نیز با حدود ۹۰ بیمار مبتلا به نقص ایمنی و خانواده‌های آنها به منظور شناسایی موتاسیون‌ها و نواقص ژنتیکی دخیل در آن بیماری‌ها تشکیل شده است. از جمله نتایج مثبت این امر، تشخیص زودهنگام این نواقص در دوران جنینی است که امکان انجام مداخلات درمانی یا پیشگیرانه را فراهم می‌کند [۱۱].

لازم به ذکر است که تأسیس بانک DNA و سرم بیماران دیابتی نیز در آذر ماه سال ۱۳۸۵ در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران به تصویب رسیده است. هدف از تشکیل این بانک در مرحله اول، جمع‌آوری تعداد بسیار زیادی نمونه از بیماران مبتلا به اختلالات اندوکرین و استفاده از سیستم‌های کدگذاری و ذخیره‌سازی آنها به ویژه با صرف وقت و هزینه کمتر است و در مرحله بعد، انجام مطالعات متعدد ژنتیکی (به ویژه پلی‌مورفیسم ژن‌های مختلف مطرح در بیماری دیابت و نیز تعیین وجود یا عدم وجود ارتباط پلی‌مورفیسم‌های مختلف با تظاهرات بالینی بیماری‌ها) نظیر مطالعات مشابه در دنیا [۱۸و۱۹و ۲۰] می‌باشد.

روش کار: برای مراحل مختلف این طرح اعم از نمونه‌گیری و انتقال نمونه‌ها[1] کدگزاری نمونه‌ها[2] و ذخیره‌سازی[3] و همچنین رعایت مسائل اخلاقی و گرفتن رضایت‌نامه کتبی از بیماران، بررسی و مطالعات بسیاری بر روی بانک‌های DNA در سراسر دنیا انجام گرفت [۱۳ – ۲] . طبق این ارزیابی‌ها، روش ذیل برای انجام مراحل مختلف در بانک DNA و سرم مرکز تحقیقات غدد مورد استفاده قرار می‌گیرد که به اختصار به شرح ذیل می‌باشد:

۱- *نمونه گیری و انتقال*: یکی از نکات مهم و مورد توجه در بررسی کلیه بانک‌های DNA ، توجه به مسائل اخلاقی و حقوق بیمار است [۱۰ و ۹] ، براین اساس فرم رضایت‌نامه بیمار تهیه گردید که محتویات مندرج در آن به قرار زیر می‌باشد: – هدف از مطالعه به صورت واضح و

1 -Sampling, Handling
2 - Labelling
3 -Storage

Archive of SID

www.SID.ir

قابل فهم، – نوع و میزان نمونه مورد نیاز و نحوه جمع‌آوری نمونه و – ذکر این مطلب که نمونه بیمار ممکن است در طرحهای دیگر مورد استفاده قرار گیرد.

به منظور انجام نمونه‌گیری ، بیماران دیابتی مراجعه کننده به درمانگاه دیابت، پس از دریافت فرم رضایت‌نامه در صورت تمایل به شرکت در طرح به آزمایشگاه هورمون (واقع در درمانگاه) ارجاع شده و حدود ۲۰cc خون در ٤ لوله EDTA گرفته شد. در ضمن پرسشنامه‌ای متشکل از کلیه اطلاعات لازم در مورد بیمار و بیماری وی توسط پزشک مربوطه در نرم‌افزار مورد نظرتکمیل گردید. این نرم‌افزار به نرم‌افزار دیگری که در آزمایشگاه موجود بوده و حاوی اطلاعات مربوط به DNA و سرم بیماران و همچنین محل نمونه‌های ذخیره شده می‌باشد، مرتبط خواهد شد. کلیه مراحلی که قبل از ذخیره‌سازی نمونه طی می‌شود، تحت عنوان Handling نامیده می‌شود که این مراحل بدین شرح می‌باشند: پس از نمونه‌گیری، نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکز تحقیقات غدد منتقل شده، سانتریفوژ می‌شوند و پلاسما از آن جدا می‌گردد. پلاسمای جدا شده از خون هر بیمار داخل چند عدد CBS^{TM} straw (لوله‌های باریک و دارای قابلیت بالا جهت ذخیره‌سازی در شرایط مختلف آزمایشگاهی) ریخته می‌شود. این کار توسط سیستم خودکاری به نام CBS^{TM} straw filling and sealing system انجام می‌گیرد. به این صورت که دستگاه لوله‌ها را پر می‌کند و سپس دو طرف لوله را به واسطه حرارت می‌بندد. سپس در آزمایشگاه ژنتیک مرکز، DNA از خون به روش Salting out استخراج می‌گردد. برآورد هزینه جهت انجام این طرح حدود یک میلیارد ریال میباشد.

۲ –*کدگذاری* : آنچه در بررسی های انجام شده بر روی نحوه کار بانک های نمونه دنیا در سال‌های اخیر قابل تامل می‌باشد، استفاده از سیستم Barcoding جهت کد گزاری نمونه ها و همچنین تعیین مکان نمونه هاتوسط نرم‌افزار مربوطه[1] می‌باشد .در اغلب موارد توسط سیستمی بنام (Laboratory Information Management Syetem: LIMS) امکان برقراری ارتباط مابین اطلاعات آزمایشگاهی و کلینیکی بیمار فراهم می‌شود [۱۵ و ١٤].

براساس نرم‌افزارهای مورد استفاده در سامانه بانک‌های DNA ، قابلیت ارائه بارکد ویژه هر نمونه (حاوی کلیه مشخصات مورد نیاز جهت شناسایی نمونه، اعم از نوع و تعداد نمونه و مقدار DNA و سرم و همچنین محل یا محل‌های ذخیره‌سازی نمونه‌ها) ایجاد می‌گردد. همانطور که گفته شد، این اطلاعات با اطلاعات بالینی بیمار مرتبط می‌باشد. سپس، از بارکد بر روی برچسب‌های ویژه با قابلیت ذخیره شدن در شرایط مختلف آزمایشگاهی، با چاپگر مخصوص این کار، تهیه شده و روی نمونه‌ها نصب می‌گردد.

۳ – *ذخیره سازی*: جهت ذخیره‌سازی نمونه‌ها، از سامانه موجود در Cryobiosystem استفاده می‌شود به این ترتیب که هر ۱۲ عدد از straw های cc ۱ – ۰/۵ در فضایی به نام Visotubes قرار می‌گیرند و هر ۱۲ Visotube با هشت رنگ متفاوت داخل مکانی به نام گابلت قرار داده می‌شوند. مزیت این سیستم ذخیره‌سازی، فشرده بودن، رنگ متفاوت جهت شناسایی بهتر و مقاومت آن به نیتروژن مایع می‌باشد؛ چرا که هر ٦ – ۲ گابلت، داخل محوطه لوله‌ای شکل دیگری بنام CBS^{tm} canisters قرار داده می‌شوند و Canister ها داخل نیتروژن مایع قرار می‌گیرند. هم پلاسما و هم DNA جهت ذخیره‌سازی طولانی مدت در فریزر ^{0c} ۸۰- قرار می‌گیرند اما پلاسما جهت ذخیره‌سازی بیش از چند سال, باید در تانک نیتروژن ذخیره گردد. در ضمن، توسط یک سامانه نرم‌افزار رایانه‌ای، مکان قرار گرفتن هر نمونه در داخل فریزر و تانک نیتروژن تعیین می‌شود (سهولت دستیابی به نمونه مورد نظر تامین گردد).

٤ –*اعتبار سنجی*[2]: با انجام یک مطالعه پایلوت که هم اکنون در مورد بیماران دیابتی در کلینیک دیابت انجام می‌شود، اعتبار طرح سنجیده می‌شود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه در مراکز تحقیقاتی مختلف دنیا، بیانگر روند رو به رشد تشکیل بانک‌های DNA با مقاصد گوناگون می‌باشد [۱۰ و ۹] که با شیوه‌ای تقریباً مشابه، کار، نمونه گیری، کدکذاری و ذخیره‌سازی نمونه‌ها را انجام می‌دهند. از جمله اهداف مورد نظر این بانک‌ها در مرحله نخست جمع آوری نمونه های متعدد با صرف هزینه کمتر

1 - Sample tracking systems

2-Validation

Archive of SID

www.SID.ir

, مطالعه بر روی عوامل ژنتیکی (به منظور کشف پلی مورفیسم‌ها و ...), همچنین نشانگرهای زیستی و اتوآنتی‌بادی‌های سرم و نیز تعیین ارتباط بین یافته های بالینی ومطالعات ژنتیکی بیماران می باشد.

از سوی دیگر در بسیاری از نقاط جهان مانند بریتانیا، تانگو، سنگاپور و استونی، مطالعات جمعیتی گسترده ای در سطح ملی در حال انجام یا راه اندازی است که این امر نقش ویژه ای در گسترش تعداد و عملکرد بانک‌های DNA در یک منطقه, ارزیابی‌های پژوهشی آن منطقه و انتشار نتایج علمی بدست آمده در محدوده ای وسیع ایفا می کند. بنابراین در مرحله بعد, تبادل اطلاعات (نمونه های موجود در بانک و یا اطلاعات بدست آمده از آنها) در سطوح ملی و بین الملل از جمله اهداف مورد نظر در اغلب بانک‌های DNA می باشد. که این امرمستلزم توجه و برنامه ریزی در امور مهمی از قبیل ساختار مدیریت, مسائل اخلاقی مطرح و نیز مسائل اقتصادی است [۱۷و۱۶]. لذا با توجه به نقش بسیار مهم بانک DNA در توسعه و پیشرفت علم, در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران نیز با هدف تحقق بخشیدن به اهداف فوق, اقدام به راه‌اندازی بانک DNA و سرم بیماران اندوکرین شده است که از اهداف اولیه طرح, جمع آوری حداقل ۱۰۰۰ نمونه در مدت ۵ سال می باشد .

سپاسگزاری

هزینه انجام این طرح توسط مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران و صندوق حمایت از پژوهشگران تامین میگردد. در پایان از سرکار خانم رضایی به دلیل ارائه نظرات ارزنده در نوشتن این گزارش تشکر می نماییم.

مآخذ

1. Vicent D, Andersson C and M . DNA Bank. http://en.wikipedia.org/wiki/DNAbank. (update: 12 December 2007)
2. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat res*. 2003; 543 (3): 217-34.
3. Holland NT, Pfleger L,Berger E, Ho A, Bastaki M. Molecular epidemiology biomarkers- sample collection and processing considerations. *Toxicol Appl pharmacol* 2005; 206 (2): 261-8.
4. Jellum E, Andersen A, Lund- Larsen P, Theodorsen L, Orj asaeter H. Experiences of the janus serum bank in Norway. *Environ health perspect* 1995; 103 (Suppl) 3: 85-8.
5. Otasuka Y. Japan bio bank- A summary. British embassy, Tokyo. www.uknow.or.jp/be_e/science/reports/Life_Sciences/34999X. (update: 11 June 2003)
6. Macnish M. Frequently Asked Questions. Western Australian institute for medical research. http://wadb.org.au (access : 23 December 2007)
7. Mota-Vieira L, Pacheco PR, Almeida ML ,Cabral R, Carvalho J, Branco CC, et all. Human DNA bank in Sao Migual Island: A resourse for genetic diversity studies. *Int Congr Ser* 1288. 2006; 388-390 .
8. Chisholm RL. Gene-Disease Associations and Treatment out comes .NorthwesternUniversity. ww.enh.org/clinicalservices/medicalgenetics/research/default (Update: 30 Augest 2006)
9. Winlaw D, Sholler G. Kids Heart Research DNA BANK. Kids Heart Research and Adolph Basser Cardiac Institute. www.chw. Edu.au. (update:1stNovember 2006)
10. Najmabadi H, Neishaburi M, Sahebjam F, Kahrizi K. Shafaghati Y, Nikzat N, et al. The Iranian Human Mutation Gene Bank. *Hum Mutat* 2003; 21:146-150.
11. Isaina A, Moin M, Pourpak Z,Rezaei N,Aghamohammadi A, Movahedi M,et al. DNA Banking of Primary Immunodeficiency Disorders in Iran. *Iran J allergy asthma immunol* 2006; 5 (4): 201-202.
12. Caulfield T, Upshur R, Daar A. DNA Data banks and consent: A suggested policy option involving on an authorization model. *BMC Medical Ethics* 2003;4:1.
13. Cambon A, Clementine S, Emmanuelle RS, knoppers BM.0 Populational genetic databases Is a specific ethical and legal framework necessary? *Gen Edit* 2005; 3: 1 –13.
14. Morisawa H, Hirota m, Toda T. Development of an open source laboratory information management system for 2–D gel electrophoresis based proteomics work flow. *BMC Bioinformatics* 2006; 4; 7: 430.
15. Jayashree B,Reddy PT,Leeladevi Y,Crouch JH,Mahalakshmi V,Buhariwalla HK,et al. laboratory Information management soft ware for genotyping workflows. *BMC Bioinformatics* 2006 17; 7: 383 .

Archive of SID

www.SID.ir

16. Godard B, Schmidtke J, Cassiman J, Ayme S.Data storage and DNA banking for biomedical research. *Eur J Hum Genet* 2003; 11, (supp2): S88-S122.
17. Amoli MM, Carthy D, Platt H, Ollier WE.EBV Immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. *Int J Epidemiol* 2008];37 (Suppl 1):i41-5.
18. González-Gay MA, Amoli MM, Garcia-Porrua C, Ollier WE.Genetic markers of disease susceptibility and severity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33(1):38-48. Review.
19. Amoli MM, Hand S, Hajeer AH, Jones KP, Rolf S, Sting C, Davies BH, Ollier WE.Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy.*Genes Immun* 2002;3(4):220-4.
20. Amoli MM, Gonzalez-Gay MA, Zeggini E, Salway F, Garcia-Porrua C, Ollier WE.Epistatic interactions between HLA-DRB1 and interleukin 4, but not interferon-gamma, increase susceptibility to giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2004;31(12):2413-7.

Archive of SID

www.SID.ir