مجله دیابت و لیپید ایران. بهار ۱۳۸۴؛ دوره ۴ (شماره ۳): ۴۱-۳۵

بررسی فراوانی جهش های DNA میتوکندریایی در دیابت نوع دو

باقر لاریجانی[۱]، مسعود هوشمند*[۲]، قمر سلطان‌دراج[۲] ، فرزانه درویش‌زاده[۱]

چکیده

مقدمه: میتوکندری یکی از ارگان‌های داخل سلولی است که DNA مخصوص به خود دارد. تا کنون تعدادی بیماری ناشی از جهش mtDNA گزارش شده است. یکی از این جهش‌ها، جهش A3243G و حذف 5kb می‌باشد. عواقب این جهش‌های ژنی طیفی از بیماری‌ها را بوجود می‌آورد که یکی از آنها دیابت نوع ۲ است. هدف از این مطالعه تعیین جهش A3243GtRNAleu و حذف 5kb در بیماران دیابتی نوع ۲ می‌باشد.

روش‌ها: DNA ۱۳۰ بیمار دیابت نوع ۲ که میزان انسولین آنها اندازه‌گیری شده بود، استخراج گردید. از روش‌های تعیین توالی، SSCP, PCR – RFLP در بررسیA3243GtRNAleu و از روش PCR multiplex در تعیین حذف 5kb استفاده شد و با ۴۰ فرد سالم مقایسه شد.

یافته‌ها: در هیچ‌کدام از بیماران مورد مطالعه جهش A3243GtRNAleu و حذف 5kb مشاهده نشد .ولی درشش بیمار جهش ژنی A3314 در منطقه mt NP1 دیده شد.

نتیجه‌گیری: جهشA3314 در منطقه حفاظت شده ژنوم جانداران قرار دارد وتا به حال گزارش نشده است پس اهمیت زیادی دارد وتحقیقات بیشتری را می طلبد . تعیین جهش‌های ژنی میتوکندریایی و درصد هتروپلاسمی آن در تعیین میزان خطر ابتلا به دیابت قبل از بروز علایم بالینی بسیار مؤثر است.

واژگان کلیدی: دیابت قندی نوع ۲ ، میتوکندری ، mtDNA، A3243G ,5kb

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

* ***نشانی:*** کیلومتر ۱۷ اتوبان کرج ، بلوار پژوهش،پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری؛ تلفن:۴۵۸۰۳۹۰؛ نمابر:۴۵۸۰۳۹۹؛ پست الکترونیک: massoudh@NIGEB.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۳/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۸

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز می‌باشد که تولید یا عملکرد انسولین یا هر دوی آنها در این بیماری دچار اشکال می‌شود [۱و۲] .

عمل اصلی انسولین، پایین آوردن قند خون و فعال کردن سامانه ذخیره‌سازی مواد غذایی مختلف در بافت‌های بدن می‌باشد، بنابراین در صورت بروز هر یک از اشکالات اشاره شده در مورد انسولین، قند خون بالا می‌رود که در صورت عدم کنترل در دراز مدت موجب بروز عوارضی چون بیماری‌های قلبی عروقی، آسیب چشم، کلیه و اعصاب خواهد شد [۲و۳].

امروزه بر اساس تقسیم‌بندی جدید، دیابت به نوع ۱، نوع ۲، دیابت حاملگی و انواع متفرقه تقسیم می‌شود. در ابتلا به بیماری دیابت وجود دو عامل ژنتیک و محیط ضروری است. بروز همزمان دیابت نوع ۲ در دوقلوهای همسان مدرک مستدلی از نقش ژن‌ها در بروز دیابت شیرین نوع ۲ می باشد [۴و۵]. برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ نقش اساسی میتوکندری در تثبیت گلوکز خون آشکار و در سال ۱۹۹۶، دیابت میتوکندریایی شناسایی شد [۶و۷].

با کمک روش‌های مولکولی، علت بیماری را جهش A3243G tRNAleu و حذف 5kb در DNA میتوکندریایی شناسایی کردند.

کل DNA میتوکندری یک سلول تنها حدود یک درصد از کل DNA آن را شامل می‌شود. یکی از ویژگی‌های mtDNA، جهش‌پذیری قابل ملاحظه آن می‌باشد. اولین جهش‌های بیماریزای mtDNA در اوایل دهه ۱۹۹۰ شناسایی شد. محدوده بیماری بالینی ناشی از جهش‌های mt DNA متنوع می‌باشد. این جهش‌ها اغلب سبب نقص عملکردی در زنجیره تنفسی می‌شوند. به‌طوری‌که در این زنجیره، آنزیم‌های غیر طبیعی هم تولید می گردند. [۸-۱۰] .اختلال در متابولیسم گلوکز به دنبال نقایص آنزیمی، نشانه‌ای از جهش در mtDNA می‌باشد [۱۰]. جهش نقطه‌ای A3243G tRNAleu در mtDNA بسته به میزان جهش باعث بیماری‌های MELAS و Leiqh ودیابت می‌شود [۱۱و۱۲]. مطالعاتی در آسیا انجام شده و میزان این جهش در جمعیت دیابتی بیماران آسیایی ۳ – ۱ درصدگزارش شده است [۱۱و۱۲]. در ایران در این زمینه تا به حال مطالعه ای انجام نشده است.

با توجه به این که تشخیص و درمان زود هنگام دیابت به هر علت اهمیت شایانی دارد و با در نظر گرفتن این مهم که تشخیص اولیه این بیماری با تعیین جهش در پیشگیری یا تأخیر بروز دیابت مؤثر است. این مطالعه طرح‌ریزی شد و هدف اصلی آن تعیین جهش‌های mtDNA در ناحیه A3243G tRNAleu و حذف 5kb در۱۳۰ بیمار دیابتی نوع دو می‌باشد.

روش‌ها

۱۳۰ بیمار دیابتی نوع ۲ مراجعه کننده به درمانگاه دیابت بیمارستان شریعتی بعد از تأیید علایم بالینی و آزمایشگاهی و تشخیص قطعی دیابت، توسط پزشک معالج انتخاب و به واحد خونگیری ارجاع شدند.۴۰ فرد غیر دیابتی نیز که به سایر درمانگاه‌های بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند و سابقه فامیلی دیابت نداشتند؛ به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. پس از اخذ رضایتنامه کتبی از بیماران، پرسشنامه‌ای شامل اطلاعات فردی ، سیر بیماری و سابقه فامیلی تکمیل شد و بر اساس آن بیماران به چند گروه تقسیم شدند. **۱**- دیابت با توارث مادری (۴مورد) **۲**- دیابت با توارث پدری (۵ مورد) **۳**- دیابت با توارث مادری و پدری (۶مورد) **۴**- سابقه خانوادگی دیابت در خویشاوندان درجه ۲ یا ۳ **۵**- .بدون هیچ سابقه فامیلی

به‌علاوه در میان بیماران، ۲ بیمار دیابت با شروع زودرس (MODY) ، ۴ بیمار با مشکلات حاد قلبی، ۸ بیمار با رتینوپاتی، ۲ بیمار با فلج عصب چشم و ۴ بیمار با دیابت به دنبال GDM مشاهده شد.

برای استخراج DNA میتوکندریایی، ml ۵ خون از بیماران و گروه کنترل گرفته شد. سه میلی‌لیتراز خون به درون فالکون‌های حاوی ۳۰۰cc محلول EDTA منتقل شد. با توجه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

به این که به نظر می رسد میتوکندری در محل رها سازی انسولین از گرانول‌های ترشح کننده آن وجود داشته و می‌تواند در میزان ترشح انسولین تأثیر بگذارد؛ بنابراین برای تعیین ارتباط بین جهشA3243G و تغییر عملکرد سلول‌های پانکراس مترشحه انسولین ، دو میلی‌لیتر از خون نیز برای اندازه‌گیری سطح انسولین با روش رادیوایمونواسی استفاده گردید. با روش نمک اشباع، DNA از نمونه خون استخراج شد. DNA حاصل تغلیظ شد تا با توجه به غلظت حاصل بتوان مقدار مناسبی از آن را برداشت نمود. پس از آن نمونه ها برای انجام DNA sequencing برای شرکت macro gene کره ارسال شد.

برای تشخیص جهش A3243G از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR استاندارد) و روش‌های تکمیلی RFLP با آنزیم Apa 1 و SSCP عمل شد و در تعیین حذف 5kb با روش PCR muliplex، قطعه مورد نظر تکثیر یافت. پس از آن نمونه‌های DNA با دستگاه ABI 3/0 تعیین توالی گردیدند.محل انجام کلیه آزمایش‌های ژنتیکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بود.

یافته‌ها

در این تحقیق ۱۳۰ بیمار دیابتی نوع ۲ با میانگین سنی (۵±۵۰) و ۴۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل بدون هیچ گونه سابقه فامیلی دیابت با میانگین سنی(۵±۴۵) انتخاب شدند.

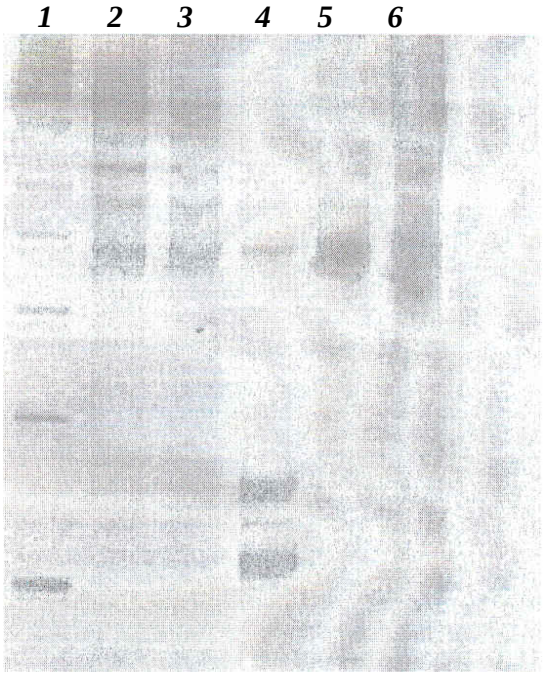
به کمک رادیوایمونواسی میزان انسولین بیماران اندازه‌گیری شد و از نظر میزان انسولین بیماران به سه گروه تقسیم شدند.

۱ – انسولین در حد طبیعی (۰/۶۴ ng/mlt – ۰/۱۶) (۹۶مورد)

۲ – انسولین بیشتر از حد طبیعی (۳۰ مورد)

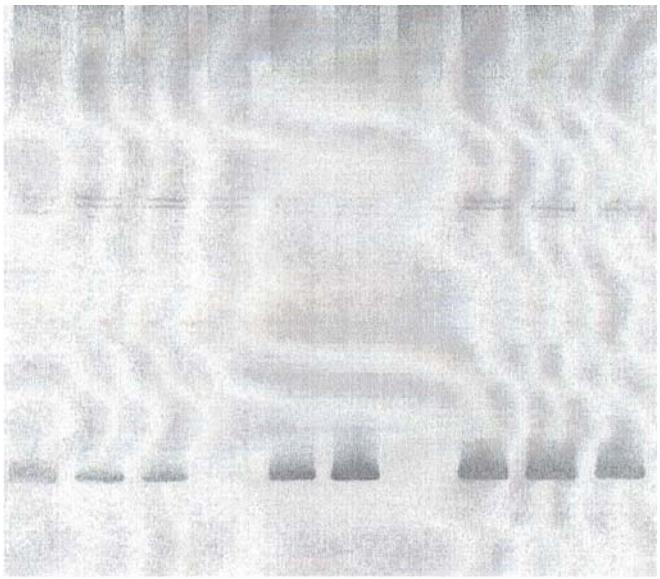
۳ – انسولین کمتر از حد طبیعی (۴ مورد)

نمونه‌های PCR – RFLP (برای عمل هضم با آنزیمApa 1) بر روی ژل آکرپلامید ۸٪ برده شد. در هیچ‌یک از بیماران جهش A3243G مشاهده نشد (شکل ۱).

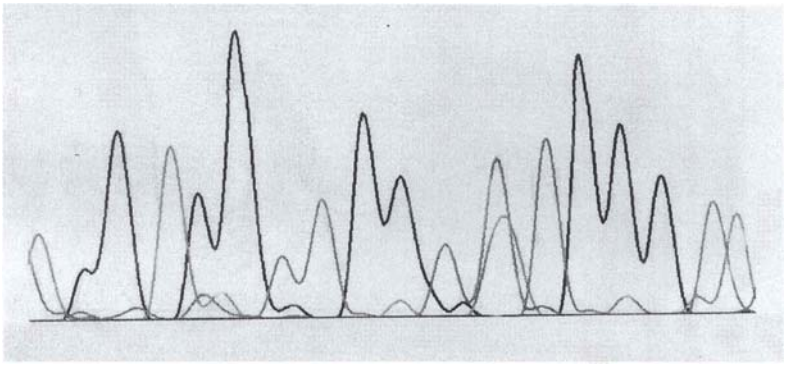


شکل ۱- چاهک شماره ۱:DNA labor ، چاهک شماره ۴:نمونهRFLPنمونه کنترل مثبت با قطعه ۲۳۷bpوقطعات ۱۱۰ و ۱۲۷bp، چاهک شماره۶: RFLPنمونه کنترل منفی قطعه ۲۳۷kb

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

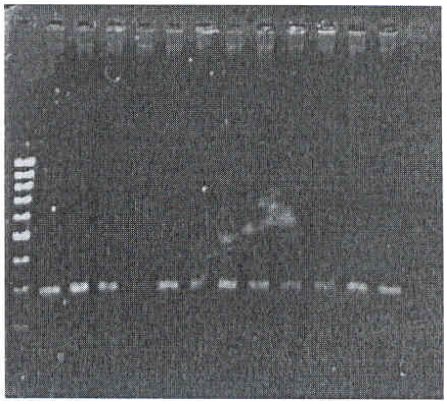


شکل ۲- نتیجهSSCP، چاهک شماره ۳:کنترل منفی در ۶ بیمار باند مشکوک دیده شد. در ۳ بیمار و کنترل منفی باند مشکوکی دیده نشد.



شکل ۳- نمودار حذف نوکلئوتیدA3314

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



شکل ۴- DNA ladder چاهک شماره۴: چاهک شماره ۲:کنترل مثبت با قطعهbp۹۰۰و ۲۷۹ bp ، ۱bpقطعه ۲۷۹ چاهک شماره۱۳:کنترل منفی در مابقی چاهک‌ها نمونه بیمار با

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

در ناحیه tRNAleu جهش های متعددی گزارش شد (ناحیه داغ یا hot spot) بنابراین نمونه‌های PCR تکثیر شده و پس از آن به روش single strand conformation polymorphism بر روی ژل آکریلامید ۱۰٪ برده شد. در ۶ بیمار ۳ باند مشکوک دیده شد (شکل ۲). سپس نمونه‌های مشکوک تعیین توالی شدند.

نتیجه تعیین توالی

حذف نوکلئوتیدی A در موقعیت A3314که یک ناحیه محافظت شده در جانوران است ،دیده شد. ۲ بیمار از ۶ بیمار دارای این حذف، دچار عارضه شدید قلبی بوده و بی‌نظمی در میزان انسولین را نشان دادند. در یک نفر از همین ۶ بیمار افزایش شدید و در یک نفرکمبود شدید انسولین دیده شد (شکل ۳).

جهت تشخیص حذف 5kb، نمونه multiplex بر روی ژل آکارز ۳٪ برده شد که در هیچ‌یک از بیماران حذفی مشاهده نشد (شکل ۴).

بحث

میتوکندری، منبع انواع اکسیژن‌های باز فعال شده[1] است. حدود ۱/۵ – ۱ درصد از اکسیژن مصرف شده در فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو تبدیل به ROS می‌شود. آنزیم دسموتاز سوپر اکسیداز، آنیون سوپر اکسید (OH) را به H_2O_2 تبدیل می‌کند که توسط آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز تبدیل به اکسیژن و آب می‌شود. فقدان یا نقصان عملکرد این آنزیم حفاظتی موجب تجمع H_2O_2 و در نهایت تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود [۱۴، ۱۳]. چون مولکول‌های mtDNA به صورت گذرا به غشای داخلی میتوکندری متصل می‌شوند، به طور گسترده در معرض اکسیداسیون قرار گرفته و آسیب می‌بینند [۱۵]. به‌دلیل سازوکارهای ضعیف میتوکندریایی، فقدان هیستون‌ها در mtDNA و سیستم ترمیمی محدود mtDNA ۱۰ تا ۲۰ برابر بیشتر از DNA هسته‌ای آسیب می بیند [۱۶]. رادیکال‌های آزاد موجب شکست ریشه‌های DNA و در نتیجه حذف و جهش نقطه‌ای در آن می‌شوند. از آنجایی‌که پروتیین رمزشده mtDNA با پروتیین رمز شده DNA هسته‌ای در درون میتوکندری ترکیب می‌شوند، در صورت بروز جهش در mtDNA، اشکالاتی در عملکرد یا ساختار آنزیم‌هایی زنجیره تنفسی ایجاد می‌شود، در نتیجه تولید ATP کاهش یافته و رادیکال‌های آزاد (ROS) بوجود می‌آیند که در نهایت صدمات بیشتری به میتوکندری وارد می‌کنند [۱۶،۱۷]. امروزه ROS یکی از مهمترین عوامل جهش‌زای mtDNA محسوب می‌شوند [۱۹، ۱۸]. مطالعاتی دیگر در مورد سایر جهش های mtDNA انجام شده و نتایجی بدست آمده است [۲۰]. در بیماران دیابتی با جهش A3243G، سلول‌های β بیشترین درصد هتروپلاسمی را نشان می‌دهند و این سلول‌ها در بررسی جهش بسیار مناسبند. متقاعد نمودن بیمار برای انجام بیوپسی پانکراس و عضلات برای بررسی مشکل است پس ممکن‌ترین راه تشخیص، استفاده از خون بیمار است. بنابراین دراین مطالعه پس از اندازه‌گیری میزان انسولین خون بیماران، DNA از لکوسیت‌های خون آنها استخراج شده و بیماران با روش PCR استاندارد PCR/SSCP, PCR/RFLP، تعیین توالی، mtDNAو PCR multiplex مورد مطالعه قرار گرفتند.

در بیماران مورد مطالعه پس از انجام آزمایش‌ها، جهش نقطه‌ای A3243G و حذف 5kb مشاهده نشد اما ۶ بیمار حذف A3314 را نشان دادند که تا کنون گزارش نشده است. این حذف در منطقه ND1 (mtDNA) قرار دارد و از لحاظ تکاملی ناحیه کاملاً حفاظت شده ژنوم جانداران می‌باشد. به‌دلیل این‌که حذف A3314 آمینواسیدهای بعد از خود را تغییر می‌دهد، موجب تغییر ساختار پروتیین ناحیه ND1 خواهد شد. در میان بیماران دارای این حذف، دو بیمار عارضه شدید قلبی داشتند. پاسخ به این پرسش که حذف این ژن عامل بیماری دیابت است یا خیر و یا دیابت منجر به این حذف شده است یا نه نیاز به بررسی‌های مولکولی وبیوشیمیایی بیشتری دارد.

عدم تشخیص حذف 5kb و جهش نقطه‌ای A3243G را می‌توان به دلیل هتروپلاسمی کمتر از ۰/۵٪ دانست، زیرا

[1] Reactive Oxygen specics

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

روش PCR/RFLP با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، هتروپلاسمی در حد ۱٪ و روش PCR – SSCP هتروپلاسمی در حد ۰/۵٪ را تعیین می‌نماید. کاهش نفوذ ژنتیکی، بروز متغیر (متفاوت) جهش در شرایط قومی و نژادی خاص بیماران مورد بررسی را می‌توان از علل این یافته در نظر گرفت.

از آنجایی‌که بررسی جهش در پیش‌گیری از بروز هیپرگلیسمی در فرزندان بیماران دیابتی که اختلالات ژنتیکی دارند و برای پیشگیری از اشکال پیچیده دیابت و دیابت بارداری (جهش A3243G در بیماران دیابت حاملگی به مراتب بیشتر از سایر بیماران دیابتی گزارش شده است) اهمیت شایانی دارد ، بنابراین ما توجه بیشتر به تعیین جهش‌های mtDNA در بیماران دیابتی که به طور معمول در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی انجام نمی شود را پیشنهاد می‌دهیم.

مآخذ

1. Expert Committee on the Diagnosis and Clasification of Diabetes Mellitus.American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2002. *Diabetes Car*e. 2002; 25(Suppl): S1-147.

۲. عزیزی ، فریدون ، فیزیولوژی غدد مترشحه داخلی چاپ سوم، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۶۹، ص ۳۵-۱۰.

3. Tusie Luna MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus: genes implicated in early onset diabetes.*Rev Invest Clin*. 2000; 52: 296-305.

4. So WY, Ng MC, Lee SC, Sanke T, Lee HK, Chan JC. Genetics of type 2 diabetes mellitus, *Hong Kong Med J*. 2000; 6: 69-76.

5. Santorelli FM, Sciacco M, Tanji K, Shanske S, Vu TH, Golzi V, Griggs RC, et al, Multiple mitochondrial DNA deletions in sporadic inclusion body myositis: a study of 56 patients.*Ann Neurol*. 1996; 39: 789-95.

6. Maassen JA. Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet*. 2002; 115: 66-70.

7. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA,Wallace DC.Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet*. 1992; 1: 11-5.

۸. علی‌یاری زنوز ، نوید ،ژنتیک در پزشکی تامپسون و تامپسون.اساس مولکولی و بیوشیمیایی بیماری‌های ژنتیک ،انتشارات تیمورزاده، ۱۳۸۱، فصل ۱۲، صفحه: ۲۸۰-۲۷۴.

9. Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH.Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin.*Mutat Res*. 1999; 423: 11-21.

10. Ohkubo K, Yamano A, Nagashima M, Mori Y, Anzai K, Akehi Y, Nomiyama R, et al.Mitochondrial gene mutations in the tRNA(Leu(UUR)) region and diabetes:prevalence and clinical phenotypes in Japan.*Clin Chem*. 2001; 47:1641-8.

11. Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Yamanouchi T, et al. Mitochondrial diabetes mellitus: prevalence and clinical characterization of diabetes due to mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene mutation in Japanese patients.*Diabetologia*. 1994; 37: 504-10.

12. Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y , et al. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA.*N Engl J Med*. 1994; 330: 962-8.

13. Houshmand M Mitochondrial DNA mutations pathogenicity and Inheritance. *Iranian Biotechnology journal*, 2003; 1: 1–18.

14. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA.*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77: 6715-9.

15. Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Vajo Z, Rotig A, Munnich A. For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality ormythochondria?*Mech Ageing Dev*. 2000; 114: 201-6.

16. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication.*Biochim Biophys Acta*. 1999; 1410:103-23.

17. Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell.*J Physiol*. 2000; 15: 529 Pt 1: 49-56.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

18. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress.*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 514-9.
19. Bohlega S, Tanji K, Santorelli FM, Hirano M, al-Jishi A, DiMauro S.Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy *Neurology.* 1996; 46:1329-34.
20. Vialettes BH, Paquis-Flucklinger V, Pelissier JF, Bendahan D, Narbonne H,Silvestre-et al, Phenotypic expression of diabetes secondary to a T14709C mutation of mitochondrial DNA. Comparison with MIDD syndrome (A3243G mutation): a case report.*Diabetes Care*. 1997; 20: 1731.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]