

بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs731236 (TaqI) در ژن VDR با بیماری نفروپاتی دیابتی نوع دو در جمعیت ایرانی

مرضیه ارشدی مشکانی^۱، مهسا محمد املی^۲، ایمان سلحشوری^۱، فریده رضی^{۳*}

چکیده

مقدمه: دیابت شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز است که سالیانه افراد زیادی را درگیر می‌کند. جمعیت زیادی از افراد مبتلا به دیابت از نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی رنج می‌برند. اثرات renoprotective ویتامین D و آنالوگ‌های آن در بیماری‌های مزمن کلیه از جمله نفروپاتی دیابتی گزارش شده است. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسم (TaqI) rs731236 در ژن رسپتور ویتامین D (VDR)، و خطر نفروپاتی دیابتی در افراد مبتلا به دیابت نوع دو است.

روش‌ها: در این مطالعه مورد - شاهد (Case-Control)، ۲۰۴ نفر از بیماران با سابقه ۵ سال ابتلا به دیابت نوع دو (۱۰۴ بیمار مبتلا به نفروپاتی و ۱۰۰ نفر بدون نفروپاتی) و نیز ۹۸ نفر افراد بدون دیابت و نفروپاتی (گروه شاهد)، مراجعه کننده به کلینیک دیابت و بیماری‌های متابولیک دانشگاه علوم پزشکی تهران بررسی شدند. پس از جمع آوری اطلاعات بالینی و انجام تست‌های آزمایشگاهی، نمونه‌های DNA از نمونه‌های خون به روش فنل کلورفرم استخراج و پلی مورفیسم TaqI (rs731236) در نمونه‌ها با روش ژنوتیپ اختصاصی TaqMan مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در گروه مبتلا به نفروپاتی، مقادیر اوره، کراتینین و دفع آلبومین بالاتر و فیلتراسیون گلومرولی کمتر از گروه دیابتی و گروه شاهد بود ($P \text{ value} < 0.05$). علی‌رغم اینکه فراوانی ژنوتیپ TT و الل T در گروه نفروپاتی بالاتر از دو گروه دیگر بود، این اختلاف معنی‌دار نبود ($P \text{ value} > 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد اگر چه پلی مورفیسم TaqI در جامعه مبتلا به نفروپاتی شیوع بیشتری دارد ولی وجود آن الزاماً با خطر ایجاد نفروپاتی دیابتی نوع دو همراه نمی‌باشد.

واژگان کلیدی: دیابت نوع دو، نفروپاتی دیابتی، ژن گیرنده ویتامین D (VDR)، ژنوتیپ، پلی مورفیسم TaqI

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران

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

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

۴- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده‌ی علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

***تشنه‌ی:** خیابان کارگر شمالی، خیابان جلال آل احمد، بیمارستان شریعتی، طبقه‌ی پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک f-razi@tums.ac.ir

مقدمه

فراوانی دیابت در سطح جهان در حال افزایش است، در سال ۲۰۱۰ حدود دویست میلیون نفر مبتلا به دیابت بوده و براساس اطلاعات سازمان جهانی بهداشت (WHO) انتظار می‌رود که در سال ۲۰۲۵ تا سیصد میلیون نفر برسد [۱]. براساس آمارهای کشوری شیوع بیماری دیابت حدود ۷/۲٪ در جمعیت بالای ۳۰ سال تهران و ۱۴/۲٪ در افراد بالای ۳۰ سال یزد (یزد در ایران رتبه‌ی اول و در دنیا رتبه‌ی دوم شیوع دیابت را دارد) بوده که نشان از اهمیت بسیار زیاد این بیماری در کشور ما می‌باشد [۲]. نارسایی مزمن کلیه در اثر دیابت مهم‌ترین علت نارسایی کلیوی مرحله‌ی انتهایی^۲ در سراسر جهان و مهم‌ترین علت مرگ زودرس بیماران دیابتی است [۳]. علت حدود ۴۰ درصد موارد ESRD، دیابت است که منجر به صرف مبلغ بیش از ۴ میلیارد دلار در سال در ایالات متحده می‌گردد. همچنین حدود ۳۰ درصد مبتلایان به دیابت نوع یک و درصد کمتری از مبتلایان به دیابت نوع دو در نهایت دچار ESRD می‌گردند. البته با توجه به شیوع بیشتر دیابت نوع دو نسبت به نوع یک تعداد کل موارد مبتلا در نوع دو بیشتر است [۴]. به همین دلیل کنترل عملکرد کلیه‌ها، در بیماران دیابتی از اهمیت خاصی برخوردار است [۳]. نفروپاتی دیابتی توسط آلبومینوری مداوم (کمتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در ۲۴ ساعت یا ۲۰۰ میکروگرم در دقیقه) مشخص می‌شود. یک مطالعه‌ی جهانی از ۳۲۲۰۸ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو در ۳۳ کشور، به‌طور کلی شیوع میکروآلبومینوری را ۳۹٪ نشان دادند. میکروآلبومینوری یک عامل خطر قوی و مستقل برای توسعه‌ی نفروپاتی دیابتی است و بالاترین شیوع آن در جمعیت آسیایی و اسپانیایی بود. قابل توجه است که در جمعیتی که در آن بیماران شناخته شده با بیشترین نرخ دفع ادرای آلبومین را داشتند به‌طور متوسط زمان شناخته شده ابتلا به بیماری دیابت آن‌ها ۸ سال بود [۵]. شیوع ESRD مرتبط با دیابت در حال افزایش در گروه‌های سنی پیرتر می‌باشد [۶]. در سال ۱۳۸۶ مطالعه‌ای در ایران در شهر

شاهرود بر روی ۳۴۰ بیمار دیابتی صورت گرفت که شیوع کلی نفروپاتی را ۱۳/۹ درصد گزارش نمود که از آمار ارائه شده در مرکز تحقیقات دیابت اصفهان که برابر ۱۹ درصد بود، کمتر می‌باشد و تقریباً مشابه آمار ارائه شده کشوری است [۷]. در مطالعه‌ای که در ایران بر روی ۴۰۰ بیمار دیابتی نوع دو در سال ۱۳۹۰ در شهرستان فریدون کنار و بر روی مراجعین به مرکز دیابت این شهرستان انجام شده است ۱۴/۵ درصد دچار عارضه کلیوی بودند [۸]. ویتامین D به‌عنوان یک مکمل لازم برای ترشح انسولین مطرح شده و کمبود گیرنده ویتامین D (Vitamin D receptor: VDR) با عدم تحمل گلوکز، مقاومت به انسولین، سندرم متابولیک و افزایش خطر دیابت همراه بوده است [۴]. مشخص شده است که ویتامین D و به‌ویژه متابولیت فعال آن ۱،۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D₃ در کنترل عملکرد طبیعی غدد درون‌ریز پانکراس به‌خصوص ترشح انسولین درگیر است؛ و عمل ویتامین D از طریق اتصال به واسطه‌ی گیرنده‌های هسته‌ای (VDR) که عضو خانواده رسپتور هورمون‌های استروئیدی است انجام می‌شود [۹]. کاهش ویتامین D در اوایل توسعه‌ی بیماری مزمن کلیوی^۳ (CKD) رخ می‌دهد و با افزایش التهاب کلیوی همراه است. یک رابطه‌ی معکوس بین میزان پلاسمایی او-۲۵-هیدروکسی ویتامین D₃ و خطر ابتلا به ESRD و مرگ در بیماران مبتلا به بیماری مزمن کلیه، مراحل ۲ تا ۵ وجود دارد [۱۰، ۹]. ژن گیرنده‌ی ویتامین D (VDR) یک ژن کاندید برای استعداد ابتلا به بیماری‌های مختلف است. مطالعات انجام شده در ارتباط پلی‌مورفیسم VDR و خطر ابتلا به دیابت نوع دو (T2DM) در جوامع مختلف قومی هنوز شفاف نشده است [۹]. مزیت عمده‌ای در طراحی مطالعه‌ی سازگاری بین بیماران دیابتی با عارضه و بدون عوارض کلیوی است. بیماران مبتلا به عوارض کلیوی با توجه به نوع دیابت به دو گروه جدا از هم تقسیم می‌شوند. مطالعه متشکل از افراد با یک قومیت برای به حداقل رساندن هتروژنسیته، قرار گرفتن در معرض تفاوت‌های زیست محیطی و زیرسازی جمعیت کمک می‌کند. تست پلی‌مورفیسم بیشتر از یک ژن

² End stage renal disease (ESRD)

³ Chronic kidney disease

شاهد ۹۸ نفر از میان افراد سالم مراجعه کننده به آزمایشگاه که به منظور بررسی سالیانه مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. این افراد گلوکز ناشتای کمتر از ۱۰۰ میلی گرم در دسی لیتر داشته و فاقد سایر معیارهای خروج (که قبلاً به آن‌ها اشاره شد)، بودند. لازم به ذکر است این مطالعه توسط کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران تأیید گردیده و شرکت کنندگان پس از کسب اطلاعات کتبی و شفاهی طرح، رضایت خود را برای شرکت در مطالعه اعلام نموده‌اند. کلیه اطلاعات افراد محرمانه بوده و تنها برای گزارش نهایی به صورت گروهی مورد استفاده قرار گرفته است.

پس از ۸ تا ۱۲ ساعت ناشتایی نمونه خون وریدی (با و بدون ضد انعقاد) و نمونه ادرار اول صبح جمع آوری شد. نمونه سرم از لوله‌ی لخته پس از انجام سانتریفیوژ (3000g, 10 min) بلافاصله جدا گردیده و در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سطح گلوکز، اوره، اوریک اسید، تری گلیسرید، کلسترول، لیپوپروتئین با چگالی بالا^۴ (HDL-C)، لیپوپروتئین با چگالی پایین^۵ (LDL-C)، کراتینین خون و نسبت آلبومین ادرار به کراتینین^۶ (ACR) با استفاده از کیت شرکت تجاری پارس آزمو ن اندازه گیری شد. سطح هموگلوبین A1C با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع (TOSOH G8) با کارایی بالا اندازه گیری شد و هم چنین از محاسبه‌ی Cockcroft-Gault برای تخمین میزان فیلتراسیون گلومرولی eGFR استفاده شد. سپس DNA، از نمونه‌ی خون کامل درون لوله‌ی EDTA به روش فنول کلروفرم استخراج گردید. کیفیت نمونه‌های DNA با روش نورسنجی جذبی با خواندن OD 260/280 با کمک دستگاه نانودراپ (ND-2000c) بررسی شده و نمونه‌های دارای کیفیت مطلوب در فریزر -۲۰ درجه‌ی سانتی گراد ذخیره شد. سپس با روش TaqMAN genotyping assay ژنوتیپ‌های مورد نظر را با کیت پروب شرکت Applied BioSystems شناسایی شد. به این ترتیب که بعد از رقیق سازی DNAهای استخراج شده به غلظت نهایی ۱۰-۲۰ نانوگرم در میلی لیتر، ژنوتیپ نمونه‌ها از نظر واریانت Taq1 با روش ۵'

اطلاعات دقیق تری در زمینه‌ی ژنتیکی را موجب می‌شود [۲۳]. تحقیقات genome wide linkage برای دیابتیک نفروپاتی لکوس‌های مستعدی را در کروموزوم ۱۲ ترسیم کرده است که مکان ژن VDR می‌باشد. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که پلی مورفیسیم‌های ژن VDR در دیابتیک نفروپاتی تأثیرگذار می‌باشند و به‌عنوان فاکتورهای پُرخطری برای ایجاد عارضه‌ی دیابتیک نفروپاتی در نظر گرفته می‌شوند. اگر ارتباط پلی مورفیسیم‌های ژن VDR بر روی بیماران دیابتی مبتلا به نفروپاتی در جمعیت ایرانی ثابت شود زمینه را برای تحقیقات بیشتر بر روی این ژن و پلی مورفیسیم‌های آن در ارتباط با بیماری دیابتیک نفروپاتی در جمعیت ایرانی فراهم می‌کند و در زمینه‌ی درمان و پیشگیری از این عارضه بسیار کمک کننده می‌باشد [۹]. این مطالعه به‌منظور بررسی ارتباط ژن VDR با نفروپاتی دیابتی اجرا گردیده است.

روش‌ها

این مطالعه از نوع مورد - شاهد (Case-Control) بوده و در سال‌های ۹۴ تا ۹۵ در کلینیک دیابت وابسته به پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید. پس از توضیحات مربوط به طرح و اخذ رضایت نامه، پرسش‌نامه ثبت اطلاعات دموگرافیک و بالینی با همکاری پزشک معالج برای هر یک از داوطلبان تکمیل گردید.

گروه مورد شامل (۲۰۴) نفر بیماران مبتلا به دیابت برای حداقل پنج سال بوده که ۱۰۴ بیمار مبتلا به نفروپاتی دیابتی (مورد ۱) و ۱۰۰ نفر مبتلا به دیابت نوع دو بدون نفروپاتی (مورد ۲) بودند. بیماران دیابتی با افزایش دفع آلبومین (آلبومین ادرار بیش از ۳۰ میلی گرم در ۲۴ ساعت و یا آلبومین/کراتینین بیش از ۳۰ میلی گرم به گرم که در دو نوبت نمونه‌گیری طی ۳-۶ ماه تأیید شده است) به‌عنوان بیمار دیابتی مبتلا به نفروپاتی در نظر گرفته شدند. گروه بدون نفروپاتی افرادی با شرایط مشابه و میزان آلبومین به کراتینین کمتر از ۳۰ میلی گرم به گرم بودند. افراد با $HbA1c > 9\%$ عفونت مجاری ادراری، فشارخون بالای کنترل نشده، نارسایی قلبی، بارداری، عفونت‌های حاد، افراد سیگاری، هماتوری و فعالیت ورزشی سنگین، گروه سنی زیر ۳۰ سال از مطالعه خارج گردیدند. گروه

⁴ High-density lipoprotein cholesterol

⁵ Low-density lipoprotein cholesterol

⁶ albumin to creatinine ratio

نسبی، آزمون مجذور کای و سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ و محاسبه شانس (OR) با درجه اطمینان ۹۵ درصد و آزمون انحراف از معادله‌ی هاردی-واینبرگ با نرم افزار SPSS استفاده گردید.

یافته‌ها

از میان ۳۰۲ فرد بررسی شده، ۵۱ درصد زن (۱۵۳ نفر) و ۴۹ درصد مرد (۱۴۹ نفر) بودند. تعداد مردان در گروه دیابتی، نفروپاتی دیابتی و شاهد به ترتیب، ۴۷، ۳۷ و ۶۵ نفر بود که نشان می‌دهد تعداد مردان در گروه نفروپاتی بیش از دو گروه دیگر بوده است.

اطلاعات دموگرافیک و نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ ذکر شده است. فراوانی آلی و ژنوتایپی سه گروه و مقایسه آن‌ها به وسیله تست Chi-Square با نرم افزار SPSS انجام شد. فراوانی ژنوتایپی و ال‌ها در جدول ۲ نمایش داده شده است.

نوکلئاز TaqMan با استفاده از پروب اختصاصی MGB (Minor Grove Binder) که توسط دو رنگ FAM و VIC نشاندار شده بودند و پرایمرهای مربوط به پلی مورفیسم TaqI که توسط Applied BioSystems طراحی شده بود تعیین گردیدند. ترکیبات موجود در واکنش حاوی DNA ژنومی، پروب، پرایمرها، آب دیونیزه و بافر TaqMan (Universal PCR MasterMix NO AmpErase UNG) بودند، که در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای براساس برنامه‌ی شرکت ABI در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید.

بهینه‌سازی شرایط PCR مطابق دستورالعمل کیت کار شده است (TaqMan®SNP Genotyping Assays:4351379)

در هر پلیت ۹۶ خانه‌ای ۹۳ چاهک حاوی DNA ژنومی با ژنوتیپ ناشناخته (undetermined) و سه چاهک انتهایی حاوی ترکیبات واکنش فاقد DNA ژنومی به منظور کنترل منفی واکنش NTC (No template control) در نظر گرفته شد. بعد از اتمام PCR شدت فلورسانس مارکرها و ژنوتیپ نمونه‌ها با دستگاه ABI 7300 Fast Real-Time PCR توسط نرم افزار SDSv.1.4 تعیین و شناسایی گردیدند. حدود ۱۰ درصد از کل نمونه‌ها و تمام نمونه‌های مشکوک از نظر درستی ژنوتیپ دوباره آزمایش گردیدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از میانگین

جدول ۱- مقایسه‌ی اطلاعات دموگرافیک و بیوشیمیایی در سه گروه

متغیر (واحد)	نفروپاتی دیابتی (تعداد=۱۰۴)	دیابتی (تعداد=۱۰۰)	شاهد تعداد=۹۸
سن (سال)	۶۲±۹/۲ ^{a,b}	۵۷±۸/۲ ^a	۵۰±۱۰/۵
فشار خون سیستولی (میلی متر جیوه)	۱۲۳±۱۳/۷ ^a	۱۲۲±۱۲ ^a	۱۱۵±۱۲/۹
فشار خون دیاستولی (میلی متر جیوه)	۷۵/۵±۹/۷ ^{a,b}	۷۸/۹±۶/۳	۷۹±۶/۳
نمایه‌ی توده‌ی بدنی (K/m ²)	۲۹/۶±۴/۲ ^a	۲۸/۴±۴/۲	۲۷/۵±۴/۲
میزان فیلتراسیون گلومرولی (L/min/1.73 m ²)	۶۴±۲۹ ^{a,b}	۷۶/۷±۲۰	۷۴/۹±۳۱
قند خون ناشتا (mg/dL)	۱۳۳±۴۵/۵ ^a	۱۴۰±۳۴/۶ ^a	۹۱/۶±۷/۸
هموگلوبین A1C (%)	۷/۳±۰/۴۷ ^{a,b}	۷/۱±۰/۷۴ ^a	۵/۵±۰/۴۷
کراتینین (mg/dL)	۱/۲±۰/۴۸ ^{a,b}	۱/۱۱±۰/۲۵ ^a	۰/۹۹±۰/۱۶
اوره (mg/dL)	۴۲/۶±۱۶ ^{a,b}	۳۶/۷±۱۳ ^a	۲۹/۸±۷/۶
اوریک اسید (mg/dL)	۵/۴±۱/۷	۵/۲±۱/۳	۴/۹±۲/۹
کلسترول (mg/dL)	۱۴۹±۳۶ ^a	۱۵۷±۳۵ ^a	۱۹۳±۴۰
تری‌گلیسرید (mg/dL)	۱۴۵±۷۵	۱۴۸±۸۱	۱۳۴±۶۸
لیپوپروتئین با چگالی بالا (mg/dL)	۴۳/۴±۱۰/۶ ^{a,b}	۴۶/۸±۹/۸ ^a	۵۱/۴±۱۲
لیپوپروتئین با چگالی پایین (mg/dL)	۷۷/۲±۲۳ ^a	۷۶/۳±۲۰ ^a	۱۰۴±۲۷
نسبت آلبومین به کراتینین (μg/mg)	۲۴۶/۷±۶۶ ^{a,b}	۲۴/۴±۵/۹	۲۲/۹±۸/۲

^a اختلاف معنی دار >۰/۰۵ با گروه شاهد

^b اختلاف معنی دار >۰/۰۵ با گروه دیابتی بدون نفروپاتی

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپی و اللی پلی مورفیسم rs731236 در گروه‌های دیابتی، نفروپاتی دیابتی و شاهد

گروه شاهد N(%)	گروه دیابتی N(%)	گروه نفروپاتی N(%)	
۱۵(۱۵/۳)	۱۶(۱۶)	۲۳(۲۲/۲)	ژنوتیپ
۳۹(۳۹/۸)	۵۱(۵۱)	۴۵(۴۳/۲)	TT
۴۴(۴۴/۹)	۳۳(۳۳)	۳۶(۳۴/۶)	CT
۰/۲۶	۰/۴۳		CC
			P value
۱/۵۷(۰/۷۶-۳/۲۲)	۱/۴۹(۰/۷۳-۳/۰۲)		OR (95%CI)
			الل
۶۹(۳۵/۲)	۸۳(۴۱/۵)	۹۱(۴۳/۷)	T
۱۲۷(۶۴/۸)	۱۱۷(۵۸/۵)	۱۱۷(۵۶/۳)	C
۰/۰۷	۰/۶۵		
۱/۴۳(۰/۹۵-۲/۱۳)	۱/۰۹ (۰/۷۴-۱/۶۲)		OR (95% CI)

ویتامین D (VDR) در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو در جنوب شرقی ایران در سال ۲۰۱۱ توسط رضا Nosratabadi و همکاران با روش PCR-RFL انجام شد. نتایج، تفاوت قابل توجه‌ای در ژنوتیپ Taq1 در ژن VDR نشان داد. نتایج ژنوتیپ‌های مختلف Taq1 در مقایسه‌ی گروه دیابتی با گروه کنترل حاکی از شیوع بالاتر ژنوتیپ tt و Tt در جمعیت دیابتی بود ($P < 0.001$). اما بین گروه‌های مختلف فراوانی الل‌های T و t معنی‌دار نبود [۱۳]. از سوی دیگر، Bid و همکاران با استفاده از پلی مورفیسم‌های Bsm1، Fok1، و Taq1 نشان دادند که هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم‌های ژن VDR و دیابت نوع دو وجود ندارد [۹]. هم‌چنین، مطالعات دیگری نیز در ترکیه و اسپانیا در نشان دادن این ارتباط ناموفق بودند [۱۴، ۱۵].

در یافته‌های ما تفاوت معنی‌داری در فراوانی اللی و ژنوتیپی Taq1 گروه نفروپاتی، دیابتی و گروه نرمال مشاهده نشد.

در مطالعه‌ی Ramos-Lopez و همکاران گزارش شده برخی هاپلوتیپ‌ها می‌توانند در مردم آلمان به‌عنوان نشانگر محافظت در برابر حساسیت به دیابت نوع یک باشند، علت حفاظت این هاپلوتیپ نادر در حال حاضر نامشخص است، هم‌چنین ممکن است به سوخت و ساز ویتامین D بدن مربوط شود [۱۶]. Mahjoobi و همکاران در مطالعات خود نشان دادند که

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود فراوانی ژنوتیپ TT در گروه نفروپاتی بالاتر از گروه دیابتی و گروه شاهد بود در حالیکه ژنوتیپ CC در گروه شاهد فراوانی بیشتری داشت ولی این اختلافات معنی‌دار نبوده است. این موضوع در مورد الل T نیز صادق بود. مجموعاً الل C بیشترین درصد فراوانی بین الل‌های گروه شاهد و مورد داشت. تعادل هاردی واینبرگ برای دو گروه مورد و شاهد برقرار بود.

بحث

واریانت rs731236 معمولاً به‌عنوان Taq1 شناخته شده و در آگزون ۹ کروموزوم ۱۲ واقع شده است [۱۱]. در این مطالعه ارتباط این پلی مورفیسم با بروز نفروپاتی دیابتی نوع دو بررسی گردید که اختلاف معنی‌داری در فراوانی آن در مقایسه با افراد دیابتی بدون نفروپاتی و افراد گروه شاهد، مشاهده نگردید. یافته‌های مطالعات برخی محققین ارتباطی بین ژنوتیپ یا هاپلوتیپ‌های پلی مورفیسم‌های VDR در افراد مبتلا به دیابت نوع یک نشان داد [۱۲] در حالی که نتایج بررسی ارتباط‌های مختلف ژنتیکی VDR و دیابت نوع دو متناقض گزارش شده است. پژوهشی با هدف بررسی ۲ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در اینترون ۸ و آگزون ۹ از ژن گیرنده

بیماران نفروپاتی دیابتی و نرمال با روش Taqman بررسی شد. تفاوت معنی داری در ژنوتیپ یا فرکانس اللی بین گروه‌های مورد و نرمال در ژن VDR نبود [۲۲]. که این نتایج منطبق با نتایج ما در جمعیت ایران می‌باشد. دلایل اختلاف بین نتایج مطالعات را می‌توان با تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت مورد مطالعه و یا عوامل محیطی مثلاً میزان نور آفتاب توضیح داد [۲۴، ۲۵].

پلی مورفیسم TaqI و FOK1 به‌عنوان بهترین و مناسب‌ترین مدل برای بیان mRNA ژن VDR گزارش شده‌اند. Ogunkolade و همکاران نشان دادند که ژنوتیپ T / T از ژن VDR با بیشترین تعداد کپی mRNA VDR مرتبط است. این گروه mRNA VDR و سطح پروتئین VDR را در رابطه با پلی مورفیسم VDR بررسی کردند و ظرفیت ترشحی انسولین را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. ژنوتیپ پلی مورفیسم‌های Apa و Taq و Fok با استفاده از TaqMan مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه این مطالعات یک ارتباط بین پلی مورفیسم VDR و ظرفیت ترشحی انسولین اعلام شد و نشان داده شد ژنوتیپ VDR یک تعیین کننده ی مهم سطح mRNA VDR و پروتئین mRNA در PBMCs است. علاوه بر این نشان داده شد که بیان VDR به‌عنوان یک عامل تعیین کننده ی ظرفیت ترشحی انسولین است [۲۶].

از آن‌جاکه مهم‌ترین عامل مؤثر بر نتایج یک آزمایش تعداد نمونه‌ها یا جامعه آماری مورد پژوهش است که می‌تواند به‌طور تأثیرگذاری نتایج حاصل از پژوهش را دستخوش تغییر کند، پیشنهاد می‌شود مطالعات آتی روی پروژه‌های مشابه با تعداد نمونه بیشتر و با بررسی هاپلوتایپ‌های مشکوک انجام گیرد. چنین اطلاعاتی در تحقیق برای عوامل ژنتیکی بیماری‌های شایع بسیار ارزشمند هستند. در مطالعه‌ی پیش رو میزان سطوح ۲۵-هیدروکسی ویتامین D3 برای نمونه‌ها در دسترس نیست، اندازه‌گیری مقدار سطح ویتامین D3 و ارتباط آن با هاپلوتایپ‌های VDR نیز می‌تواند یک مزیت در مطالعات آینده باشد.

پلی مورفیسم FokI از ژن VDR با دیابت نوع دو در مردم تونس در ارتباط نیست [۱۷]. Wang و همکاران در سال ۲۰۱۲ با متآنالیز پژوهش‌های مختلف از جمله ۷۹ مطالعه روی دیابت نوع یک و ۴۴ مطالعه روی دیابت نوع دو نشان دادند که ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم ApaI و TaqI با خطر ابتلا به دیابت وجود ندارد [۱۸].

پلی مورفیسم‌های ژن VDR در بیماران دیابتی نوع دو در جمعیت لهستانی نیز بررسی شد ارتباطی بین فراوانی ژنوتیپی واللی و هاپلوتیپی سه پلی مورفیسم BsmI/ApaI/TaqI گزارش نشد [۱۹]. در بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن گیرنده ویتامین D (TaqI, FokI) و عوارض میکرو / ماکروواسکولار در زنان یائسه‌ی مبتلا به دیابت نوع دو در برزیل، تفاوت معنی داری در فراوانی اللی و ژنوتیپی دو پلی مورفیسم دیده نشد [۲۰]. مطالعه‌ای با هدف بررسی ارتباط بین سندرم متابولیک با دیابت نوع دو و حضور پلی مورفیسم‌های (TaqI, ApaI, BsmI, FokI) ژن گیرنده ویتامین D در افراد ایرانی مبتلا به دیابت نوع دو روی ۷۳۰ نفر (۳۷۲ بیمار و ۳۵۸ شاهد) با استفاده از روش RFLP انجام شد. هیچ مدرکی دال بر ارتباط بین پلی مورفیسم ژن گیرنده ویتامین D و خطر ابتلا به دیابت نوع دو و سندرم متابولیک در افراد ایرانی پیدا نشد [۲۱].

علی‌رغم اینکه اثر حفاظتی ویتامین D و آنالوگ‌های آن در بیماری مزمن کلیه از جمله نفروپاتی دیابتی (DN) گزارش شده است [۲۲]، مطالعات مرتبط با پلی مورفیسم ژن VDR نفروپاتی دیابتی به‌طور محدود انجام شده است. در سال ۲۰۱۲ Marcela و همکاران نقش واریانت‌های منتخب از جمله پلی مورفیسم TaqI در ژن VDR و PTH در استعداد ابتلای افراد به دیابت نوع یک و دو، نفروپاتی دیابتی و بیماری کلیوی غیر دیابتی در جمعیت چک را مورد بررسی قرار دادند. از میان تمامی واریانت‌های منتخب مقایسه گروه نفروپاتی دیابتی و افراد سالم برای پلی مورفیسم FOKI در ژن VDR و هم‌چنین برای پلی مورفیسم BstBI در ژن PTH تفاوت معنی داری مشاهده شد (P= 0.023). ولی پلی مورفیسم TaqI و سایر واریانت‌ها ارتباط معنی داری نشان ندادند [۲۳]. خطر ۸ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی از جمله rs731236 TaqI T>C، در سال ۲۰۱۰ توسط Martin و همکاران در ایرلند شمالی در

سپاسگزاری

اجرای این مطالعه با حمایت مالی پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. از تمامی

دوستان و همکارانی که در این مرکز و کلینیک دیابت و بیماریه‌ای متابولیک تهران همکاری لازم را مبذول داشتند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

مآخذ

1. Arababadi MK, Mirzaei MR, Sajadi SMA, Hassanshahi G, Ahmadabadi BN, Salehabadi VA, et al. Interleukin (IL)-10 gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes with and without nephropathy: a study of patients from the southeast region of Iran. *Inflammation*. 2012;35(3):797-802.
2. Ayodele OE, Alebiosu CO, Salako BL. Diabetic nephropathy--a review of the natural history, burden, risk factors and treatment. *Journal of the National Medical association*. 2004;96(11):1445.
3. Buffon MP, Carpena MP, Sortica DA, Santer A, Carlessi R, Souza BM, et al. rs1888747 polymorphism in the FRMD3 gene, gene and protein expression: role in diabetic kidney disease. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2016;8(1):3.
4. Zhang H, Wang J, Yi B, Zhao Y, Liu Y, Zhang K, et al. BsmI polymorphisms in vitamin D receptor gene are associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes in the Han Chinese population. *Gene*. 2012;495(2):183-8.
5. Rossing P. Diabetic nephropathy: worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history. *Current diabetes reports*. 2006;6(6):479-83.
6. Lim AK. Diabetic nephropathy—complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014;7:361-81.
۷. عباسیان، مریم؛ دلوریان زاده، مه‌ری. بررسی عوارض دیابت در بیماران مراجعه کننده به کلینیک دیابت شهر شاهرود. *مجله دانش و تندرستی* ۱۳۸۶؛ دوره ۲ (شماره ۴): ۱۵-۱۹
۸. حشمتی، هاشم؛ بهنام پور، ناصر؛ خراسانی، فرشته؛ خواجوی، سمانه. شیوع عوارض مزمن دیابت در بیماران دیابتی نوع ۲ مراجعه کننده به مرکز دیابت شهرستان فریدون کنار در سال‌های ۸۹-۱۳۹۰. خلاصه مقالات اولین همایش ملی تحقیقات کاربردی در سلامت همگانی و توسعه پایدار. ۱۳۹۱؛ (۱):۱.
9. Bid HK, Konwar R, Aggarwal C, Gautam S, Saxena M, Nayak VL, et al. Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. 2009.
10. Calle C, Maestro B, García-Arencibia M. Genomic actions of 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC molecular biology*. 2008;9(1):65.
11. Poon AH, Gong L, Brasch-Andersen C, Litonjua AA, Raby BA, Hamid Q, et al. Very important pharmacogene summary for VDR. *Pharmacogenetics and genomics*. 2012;22(10):758.
12. Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine A-P, Simell O, Knip M, et al. Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *European Journal of Endocrinology*. 2003;149(6):591-6.
13. Nosratabadi R, Arababadi MK, Salehabad VA. Vitamin D receptor polymorphisms in type 2 diabetes in southeastern Iranian patients. *Laboratory Medicine*. 2011;42(1):4-32.
14. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta*. 2006;371(1):1-12.
15. Dilmeç F, Uzer E, Akkafa F, Kose E, van Kuilenburg AB. Detection of VDR gene ApaI and TaqI polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2010;24(3):186-91.
16. RAMOS-LOPEZ E, Jansen T, Ivaskevicius V, Kahles H, Klepzig C, Oldenburg J, et al. Protection from type 1 diabetes by vitamin D receptor haplotypes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1079(1):327-34.
17. Mahjoubi I, Kallel A, Sbaï MH, Ftouhi B, ben Halima M, Jemaa Z, et al. Lack of association between FokI polymorphism in vitamin D receptor gene (VDR) & type 2 diabetes mellitus in the Tunisian population. *The Indian Journal of Medical Research*. 2016;144(1):46.
18. Wang Q, Xi B, Reilly KH, Liu M, Fu M. Quantitative assessment of the associations between four polymorphisms (FokI, ApaI, BsmI, TaqI) of vitamin D receptor gene and risk of diabetes mellitus. *Molecular biology reports*. 2012;39(10):9405-14.
19. Malecki M, Frey J, Moczulski D, Klupa T, Kozek E, Sieradzki J. Vitamin D receptor gene

- polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. 2003;111(08):505-9.
20. Maia J, da Silva AS, do Carmo RF, de Mendonça TF, Griz LHM, Moura P, et al. The association between vitamin D receptor gene polymorphisms (TaqI and FokI), Type 2 diabetes, and micro-/macrovascular complications in postmenopausal women. *The Application of Clinical Genetics*. 2016;9:131.
 21. Shab-Bidar S, Neyestani TR, Djazayeri A. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes in Iranian Subjects: No Association with Observed SNPs. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2017;1(1):1-10.
 22. Martin RJ, McKnight AJ, Patterson CC, Sadler DM, Maxwell AP. A rare haplotype of the vitamin D receptor gene is protective against diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010;25(2):497-503.
 23. Vedralová M, Kotrbova-Kozak A, Železníková V, Zoubková H, Rychlík I, Černá M. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and parathyroid hormone gene in the development and progression of diabetes mellitus and its chronic complications, diabetic nephropathy and non-diabetic renal disease. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2012;36(1):1-9.
 24. Simmons RA. Role of metabolic programming in the pathogenesis of β -cell failure in postnatal life. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2007;8(2):95-104.
 25. Simmons RA. Developmental origins of adult disease. *Pediatric Clinics of North America*. 2009;56(3):449-66.
 26. Ogunkolade B-W, Boucher BJ, Prah JM, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K, et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes*. 2002;51(7):2294-300.

ASSOCIATION STUDY BETWEEN RS731236 POLYMORPHISMS OF VDR GENE AND DIABETIC NEPHROPATHY TYPE 2 AT IRANIAN POPULATION

Marzieh Arshadi Mashkani¹, Mahsa Mohammad Amoli², Iman Salahshorifar¹, Farideh Razi^{*3,4}

1. *Department of Biology, School of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
2. *Metabolic Disorders Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
3. *Diabetes Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
4. *Metabolic Disorders Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

ABSTRACT

Background: Diabetes is the most common endocrine disorder that affects many people every year. Diabetic nephropathy is main complication of diabetes type 2. Renoprotective effects of vitamin “D” in chronic kidney disease have been reported that including diabetic nephropathy. The purpose of this study is to investigate the association between polymorphism (rs731236 (Taq1)) at gene receptor vitamin D (VDR), and the risk of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes.

Methods In this case-control study, 104 patients with type 2 diabetes and nephropathy, 100 patients with type 2 diabetes and no nephropathy, and 98 people without diabetes and nephropathy who referred to the Diabetes Clinic of Tehran University of Medical Sciences were included. Clinical data were obtained and biochemical parameters were measured. The DNA samples were extracted from blood samples by phenol chloroform method. The TaqI polymorphism (rs731236) was studied by TaqMan specific genotypes.

Results: Urea, creatinine and urine albumin values were significantly higher and glomerular filtration rate was lower in nephropathy group. Although frequency of TT genotype and also T allele was higher in nephropathy group, the difference was not significant.

Conclusion: There was no association between Taq1 polymorphism and diabetic nephropathy in the studied population

Keywords: Type 2 diabetes, Diabetic nephropathy, Vitamin D receptor gene (VDR), Genotype, polymorphism Taq1

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