Association of rs1800624 Polymorphism in Receptor for Advanced Glycation End Products Gene Promoter with the Risk of Diabetic Nephropathy

Iman Salahshourifar[1], Abbas Tavakoli[2], Navid Mohammadi[3], Elham Hajialilo[4], Hossein Piri[5]

1. Assistant professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9987-1188

2. MSc student, Student Research Committee, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2965-3983

3. Professor, School of medicine, children's growth research center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0002-0534-0763

4. Assistant professor, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2159-4066

5. Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for prevention of Non-Communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-283-3336001-6, Email: hosseinpiry@gmail.com. ORCID ID: 0000-0001-8402-7742

ABSTRACT

Background and Aim: Although the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy are still unclear, the role of advanced glycation end products (AGEs) and their associated receptors (AGER) in initiating the inflammatory process in this disease has attracted attention. The aim of this study was to investigate the relationship between rs1800624 polymorphism of AGER gene with risk of diabetic nephropathy in Iranian population.

Materials and Methods: In this case-control study, patients were divided into two groups, group1 without diabetic nephropathy (n = 71) and group2 with diabetic nephropathy (n = 79). TETRA-Primer ARMS-PCR technique was used to determine the frequency of genotype and allele of rs1800624 polymorphism in the promoter region of AGER gene. Using standard methods, biochemical tests including measurement of glucose, creatinine, glycosylated hemoglobin and blood urea nitrogen and calculation of eGFR were performed. We used SPSS and FAMHAP softwares for data analysis.

Results: The results showed that AA genotype rs1800624 polymorphism in the promoter region of the AGER gene may be associated with an increased risk of diabetic nephropathy. Allele analysis also showed that allele A of the polymorphism may be associated with an increased risk of developing nephropathy, although the results were not statistically significant between the two groups in relation to rs1800624 polymorphism.

Conclusion: The findings of this study showed that there was no statistically significant relationship between rs1800624 polymorphism in AGER gene with diabetic nephropathy in the Iranian population, but increase in sample size may result in a tendency to develop diabetic nephropathy.

Keywords: Diabetic nephropathy, AGER gene, Polymorphism, Iranian population

Received: Aug 23, 2020 **Accepted:** July 13, 2021

How to cite the article: Iman Salahshourifar, Abbas Tavakoli, Navid Mohammadi, Elham Hajialilo, Hossein Piri. Association of rs1800624 Polymorphism in Receptor for Advanced Glycation End Products Gene Promoter with the Risk of Diabetic Nephropathy.SJKU 2022;27(3):1-9.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

ارتباط پلی مورفیسم rs1800624 در پروموتر ژن گیرنده محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته با خطر نفروپاتی دیابتی

ایمان سلحشوری فر[۱]، عباس توکلی[۲]، نوید محمدی[۳]، الهام حاجی علیلو[۴]، حسین پیری[۵]

۱. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران ، کد ارکید: ۱۱۸۸-۹۹۸۷-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید:۳۹۸۳-۲۹۶۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. استاد، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات رشد کودکان، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۰۷۶۳-۰۵۳۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۴. استادیار، مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۴۰۶۶-۲۱۵۹-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۵. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پیشگیری از بیماری های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۲۸۳۳۳۳۶۰۰۱، پست الکترونیک: hosseinpiry@gmail.com ، کد ارکید: ۷۷۴۲-۸۴۰۲-۰۰۰۱-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: اگر چه مکانیسم‌های مولکولی دخیل در پاتوژنز نفروپاتی دیابتی هنوز مبهم است، اما نقش محصولات نهایی گلیکا سیون پیشرفته (Advanced Glycation End Products, AGEs) و گیرنده مرتبط با آن (AGE Receptor, AGER) در شروع فرایند التهابی در این بیماری مورد توجه قرار گرفته است. پژوهش حاضر با هدف بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs1800624 ژن AGER در جمعیت ایران انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، بیماران شامل دو گروه بدون نفروپاتی دیابتی (۷۱ نفر) و با نفروپاتی دیابتی (۷۹ نفر) بود ند. برای تعیین فراوانی ژنوتیپ و آ لل پلی مورفیسم rs1800624 ناحیه پروموتر ژن AGER از تکنیک TETRA-Primer ARMS-PCR استفاده گردید. آزمایش‌های بیوشیمی شامل اندازه‌گیری گلوکز، کراتینین، هموگلوبین گلیکوزیله و نیتروژن اوره خون و محاسبه eGFR به کمک روش های استاندارد انجام شد و آنالیز آن ها به کمک نرم افزار SPSS و FAMHAP صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ممکن است ژنوتیپ AA پلی مورفیسم rs1800624 در ناحیه پروموتر ژن AGER با ریسک افزایش یافته بیماری نفروپاتی دیابتی ارتباط داشته باشد. همچنین آنالیز آلل‌ها نشان داد که الل A پلی مورفیسم مذکور ممکن است با افزایش ریسک ایجاد نفروپاتی مرتبط باشد، گرچه نتایج در مجموع بین دو گروه بدون نفروپاتی دیابتی و با نفروپاتی دیابتی برای پلی مورفیسم rs1800624 این ارتباط از لحاظ آماری معنی دار نبود.

نتیجه‌گیری: یافته های این مطالعه نشان داد که از لحاظ آماری ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم rs1800624 در ژن AGER با نفروپاتی دیابتی در جمعیت ایران وجود ندارد گرچه با افزایش حجم نمونه، تمایل به سمت ایجاد نفروپاتی دیابتی محتمل است.

کلمات کلیدی: نفروپاتی دیابتی، ژن AGER، پلی مورفیسم، جمعیت های ایرانی

وصول مقاله:۹۹/۶/۲ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۰/۱/۲۵ پذیرش:۱۴۰۰/۴/۲۲

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

مقدمه

نفروپاتی دیابتی یک عارضه مزمن میکرووا سکولار نا شی از د یابت ملیتوس بوده و به عنوان یک بیماری پیشـــرونده در بافت کلیه شـــناخته می‌شـــود که با علائمی چون آلبومینوری پـایـدار و کـاهش میزان فلیتراســـیون گلومرولی(GFR) مشـــخص می‌شـــود (۱). اگرچه طول دوره و شـــدت بیماری دیابت ملیتوس و کنترل ضـــعیف گلوکز خون از فاکتورهای مهم ایجاد نفروپاتی د یابتی اســـت؛ اما با توجه به هتروژن بودن این بیماری، فاکتورهای مختلف ژنتیکی و محیطی در ایجاد آن نقش دار ند (۲). با وجودی که گفته می شـــود محصولات نهایی گلیکا سیون پیشرفته (AGE) دارای نقش احتمالی در شـــروع بیماری نفروپاتی دیابتی اســـت؛ اما هنوز مکانیســـم‌های مولکولی و ژنتیکی ایجاد کننده این بیماری همچنان ناشـناخته اسـت. AGE احتمالاً از طریق ایجاد تغییر در پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و پروتئین‌های داخل سلولی (۳) و نیز فعال سازی گیرنده AGE (AGER) که از ابر خانواده ایمنوگلوبولین ها اســـت در ایجاد نفروپاتی نقش داشـــته باشـــد (۴). تعامل AGE با AGER باعث شـــروع آبشـارهای انتقال علامت و بیان ژن فاکتورهای رونویسـی از قبیل NF-κB و به دنبال آن بیان ژن VEGF ، سـیتوکین های پیش التهابی مانند TGF-β، IL-6 ، IL-8، TNF-α و AGER مـی‌گـردد کـه نـتـیـجـه آن ایـجـاد گـونـه‌هـای پروترومبوتیک، استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی منجر به نقص عملکردی عروقی اســـت ((۵, ۶). اثرات پاتوژنیک ژن AGER در عروق باعث شده است که در ایجاد عوارض میکروواســـکولار در د یابت مورد تو جه ز یادی قرار گیرد (۷)). گر چه در پایگاه های اطلا عاتی ایرانی مثل ایرانوم اطلاعاتی در مورد وار یانت rs1800624 گزارش نشـــده ا ست؛ اما مطالعه ای که در ایران روی بیماران مبتلا به مالتیپل اسـکلروزیس صـورت گرفته اسـت نشـانگر هتروزیگوسـیتی بالای این واریانت در جمعیت ایران باشد (۸). از سوی دیگر مطالعات مرتبط در سـایر جمعیت ها نشـان داده اسـت که در میان پلی مورفیســم های مختلف در نواحی اگزون، اینترون و پروموتر ژن AGER، پلی مورفیســـم rs1800624 در ناحیه پروموتر دارای جایگاه ویژه‌ای اســـت؛ زیرا مشـــخص شـــده اســـت که در شـــرایط آزمایشـــگاهی نقش مهمی در افزایش فعالیت رونویســـی از ژن AGER دارا اســـت ((۹). مطالعات گذشته نشان داده است که تعامل بین AGE-AGER دارای نقش مهمی در ایجاد عوارض میکرواسکولار دیابت ملیتوس نوع دو مانند نفرو پاتی د یابتی را دارد. این نقش به ویژه با مطالعات صورت گرفته بر روی مدل های حیوانی و از طریق آنتاگونیســـم های فارماکولوژیکی یا حذف ژن AGER تقویت گردیده ا ست (۱۰ , ۱۱). پلی مورفیسم های مختلفی در ژن AGER شناسایی شده است و شماری از مطالعات، ارتباط آن‌ها را با عوارض عروقی مورد بررسی و مطالعه قرار داده ا ند. نتایج حاصـــل از مطالعات مربوط به عوارض میکروواســـکولار بعضـــاً نتایج متناقضـــی را در جمعیت‌های مختلف نشان داده است؛ بنابراین مطابق با مطالعات ذکر شده در بـالا در ارتبـاط بـا اثرات پلی مورفیســـم هـای مختلف AGER در ایجـاد اختلالات کلیوی (۱۲) و بـا توجـه بـه اهمیت توالی ناحیه پروموتر در میزان بیان ژن ها و عدم انجام مطالعه در جمعیت ایران، پلی مورفیســـم rs1800624 در ناحیه پروموتر ژن مذکور به عنوان اولین مطالعه برای برر سی ارتباط آن‌ها با نفروپاتی دیابتی در جمعیت دیابتی های نوع دو ایران انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه: در مجموع ۱۵۰ بیمار با محدوده سنی ۴۵ تا ۷۰ سال از نژاد سفیدپوست (ایرانی) با تشخیص دیابت نوع دو بر اسـاس سـه معیار میزان گلوکز خون ناشـتا، گلوکز دوســـاعته و میزان HbA1c (۱۳)، دارای حداقل ۵ ســـال و حداکثر ۱۰ سـال سـابقه بیماری (با میانگین ۷/۲ سـال) که به صـــورت منظم حداقل ســـالی ســـه بار جهت کنترل عوارض دیابتی در کلینیک بیماری‌های متابولیکی بیمارســـتان رازی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

قزوین مورد ارز یابی قرار می‌گرفتند. از این تعداد، ۷۹ نفر بیمار دیابتی نوع دو دارای عارضه نفروپاتی و ۷۱ نفر بیمار دیابتی نوع دو بدون عارضه نفروپاتی بودند که وارد مطالعه گردیدند. افرادی که دارای مصرف دائمی دخانیات و یا الکل و بیماران مبتلا به دیابت به دلیل بیماری های زمینه‌ای اندوکرینی مانند سندرم کوشینگ بودند از مطالعه خارج شدند. همچنین در ارتباط با سنجش میزان مقاومت به انسولین (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance, HOMA-IR) نمونه هایی که تزریق انسولین اگزوژنیک داشتند در محاسبه مذکور حذف شدند. این مطالعه با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1396.207 انجام گردید. HOMA-IR)

جمع آوری نمونه؛ بعد از ثبت اطلاعات دموگرافی، از بیماران، نمونه‌گیری لازم صورت گرفت. خون سیاهرگی بدون ضد انعقاد جهت آزمایش‌های بیوشیمیایی و خون سیاهرگی حاوی ضد انعقاد EDTA جهت انجام آزمایش هموگلوبین گلیکوزیله (Hemoglobin A1c, HbA1c) وCBC و استخراجDNA استفاده گردید. نمونه ادرار مورد نیاز نیز برای انجام آزمایش آنالیز ادرار و میکروآلبومین ادرار جمع آوری گردید.

آنالیز بیوشیمیایی: آزمایش‌های بیوشیمی شامل اندازه‌گیری کراتینین، گلوکز، نیتروژن اوره خون (BUN) با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر Selectra XL، سنجش انسولین با روش الایزا کیت مونوبایند (Insulin-R) و با دستگاه الایزا ریدر Anthoans2020، آزمایش CBC به وسیله دستگاه سل کانتر Sysmex-KX21-N و HbA1C با روش Immuno-turbidimetry enhanced by latex particle و به وسیله دستگاه اتوآنالیزر Selectra E انجام شد. میزان برآوردشده فیلتراسیون گلومرولی (Estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) افراد با استفاده از فرمول Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, CKD-EPI, Creatinine Equation (۱۴) و HOMA-IR با استفاده از فرمول Fasting insulin (microU/L) ×fasting glucose (mg/dl)/405 محاسبه گردید (۱۵).

تشخیص نفروپاتی دیابتی: آزمایش‌های غربالگری ترجیحی برای شناسایی نفروپاتی دیابتی، کراتینین سرم برای محاسبه eGFR و میزان دفع آلبومین (Albumin Excretion Rate, AER) ادرار صبحگاهی بدون آمادگی است (۱۶) که در این مطالعه نیز مبنای تشخیص نفروپاتی دیابتی، میزان eGFR کمتر از 60 ml/min/1.73m^2 بود و محاسبه eGFR با روش CKD-EPI انجام شد؛ بنابراین بر اساس نتایج آزمایشگاهی مربوط به سنجش کراتینین و تعیین میزان eGFR، افراد به دو گروه تقسیم شدند: گروه اول که به عنوان کنترل محسوب می‌شوند، شامل بیماران دیابتی نوع دو بدون نفروپاتی (با eGFR بالاتر از ۶۰ ml/min/1.73 m^2) و گروه دوم که به عنوان بیمار محسوب می شوند، شامل بیماران دیابتی نوع دو با نفروپاتی دیابتی (با eGFR کمتر از ۶۰ ml/min/1.73 m^2) بودند.

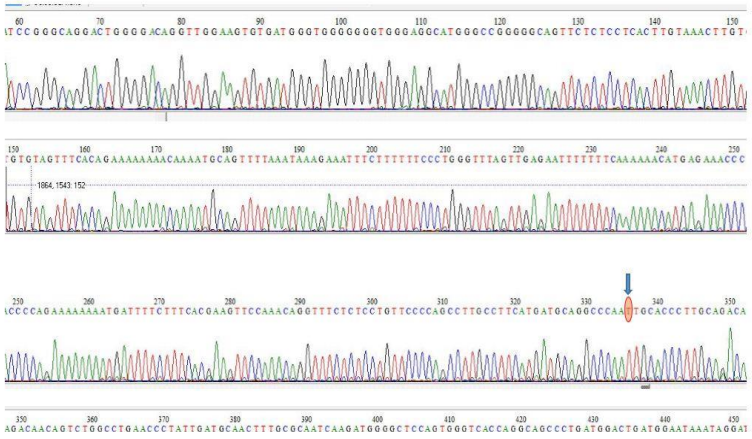
استخراج DNA ژنومیک: استخراج DNA از سلول‌های لکوسیتی خون محیطی بر اساس پروتکل کیت EURX (Poland)صورت گرفت. جهت ارزیابی میزان و خلوص DNAاستخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده گردید که اساس آن بر اندازه‌گیری میزان جذب نوری نمونه در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بود (۱۷). با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز دو درصد، یکپارچگی قطعات DNA ژنومی استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸).

ژنوتایپینگ، آزمون تعادل هاردی وینبرگ (HWE)و آنالیز SNP :برای انجام ژنو تایپینگ بر روی DNA استخراج شده، از روش TETRA-Primer ARMS-PCR استفاده گردید (۱۹). توالی پرایمر های فوروارد و ریورس خارجی (5’-3’) مورد استفاده برای ژن AGER با توالی مرجع

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

NM_001206929 و با کد رفرنس واریانت rs1800624 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs1800624) به ترتیب شامل "AGTGCCGGAGAACTACGAACCATGAC" و "GAGAGAGCCCCGGTTCCTATTATAT" بود که ایجاد محصول PCR با طول ۴۹۶ جفت باز می‌نمود. همچنین توالی پرایمرهای فوروارد داخلی (آلل A) و ریورس داخلی (آلل T) با جهت (5'-3') مورد استفاده نیز به ترتیب شامل "CCTTGCCTTCATGATGCAGGCCCTAA" و "GCCAGACTGTTGTCTGCAAGGGTGGA A" بود که به ترتیب، محصولات PCR ایجاد شده، ۱۵۵ و ۳۹۳ جفت باز طول داشت. پرایمرهای مذکور به کمک نرم‌افزار آنلاین پرایمر ۱ (http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html) و نیز از مقالات مرتبط با این پژوهش برداشت (۲۰) و آنالیز بیوانفورماتیکی مناسب روی آن انجام و صحت عملکرد آن مورد تائید قرار گرفت. محصولات PCR جهت بررسی پلی مورفیسم rs1800624 مربوط به ژن AGER در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تائید صحت نتایج، برخی از نمونه های محصولات PCR توالی یابی گردید (شکل ۱) که در Gene Bank پایگاه اطلاعاتی PubMed با شماره کد دستیابی (Accession Number: MN108261) قابل دسترسی است.



شکل ۱. نتایج توالی یابی یکی از نمونه‌های مورد مطالعه مربوط به ناحیه پروموتر ژن گیرنده AGE. DNA های توالی یابی شده تو سط نرم افزار Chromas مورد ارزیابی قرار گرفته و با نتایج حا صل از ژنوتایپینگ که به روش انجام شده بود مورد مقایسه قرار گرفت. مکان SNP مورد مطالعه به صورت رنگی (نارنجی رنگ) و با فلش نشان داده شده است.

تحلیل آماری: از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ جهت آنالیز آماری پارامترهای بیوشیمیایی استفاده گردید. همچنین از نرم افزار FAMHAP برای انجام آزمون تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) و محاسبه نسبت شانس (OR) استفاده شد (۲۱).

نتایج

در این مطالعه مبنای تشخیص نفروپاتی دیابتی بر اساس eGFR کمتر از 60 ml/min/1.73m^2 بود و محاسبه eGFR با روش CKD-EPI انجام شد. ویژگی های دموگرافیک، بالینی و آزمایشگاهی افراد مورد سنجش قرار گرفت. همان‌گونه که جدول ۱ نشان می دهد تفاوت های معنی داری در دوره بیماری، شاخص توده بدنی (BMI) و eGFR وجود داشت ($p<0.05$)؛ اما در میزان FBS،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

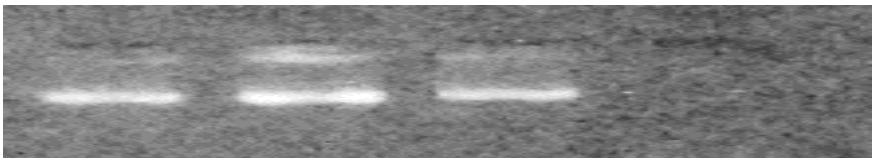
2hpp و HbA1c تفاوت معنی داری در دو گروه وجود نداشت ($p>0.05$).

جدول ۱. ویژگی های دموگرافیک، بالینی و آزمایشگاهی دو گروه بدون نفروپاتی دیابتی و با نفروپاتی دیابتی. مقادیر مربوط p-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شده است.

متغیر	افراد با نفروپاتی دیابتی (M±SD)	افراد بدون نفروپاتی دیابتی (M±SD)	p-value
تعداد موارد	۷۹	۷۱	-
مذکر/مؤنث	۵۸/۲۱	۳۴/۳۷	-
سن (سال)	۶۲/۳ ± ۵/۶	۵۴/۲± ۷/۱	-
دوره بیماری	۷/۷۳±۱/۵۳	۶/۶۲±۱/۴۱	< ۰/۰۰۱
شاخص توده بدنی	۲۶/۶ ± ۲/۹	۲۷/۵± ۲/۴	۰/۰۴۶
قند خون ناشتا (mg/dl)	۱۸۵/۸±۸۶/۹	۱۷۸/۶±۷۱/۵	۰/۵۸۷
قند خون دو ساعت بعد از غذا (mg/dl)	۳۳۴ ±۱۰۲	۳۰۹±۸۶	۰/۱۰۷
هموگلوبین گلیکوزیله (٪)	۸/۴±۱/۸	۸/۲±۱/۶	۰/۴۹۳
میزان برآوردشده فیلتراسیون گلومرولی (ml/min)	۴۸/۰۳±۱۰/۴۶	۶۸/۸۹±۷/۲۸	< ۰/۰۰۱

نتایج مربوط به الکتروفورز DNA استخراج شده از سلول های لکوسیتی خون محیطی بر روی ژل آگارز دو درصد جهت نمایش یکپارچگی قطعات ژنومی در شکل ۲ نشان داده شده است که نشانگر تخلیص مناسب DNA است

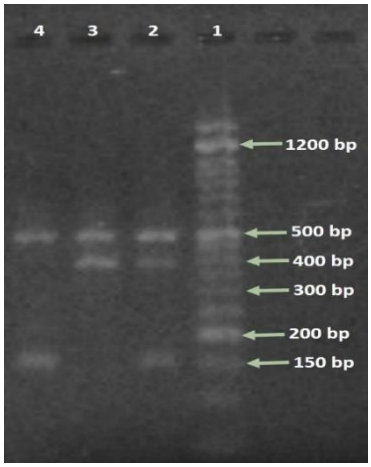
شکل ۲. نتایج مربوط به الکتروفورز DNA استخراج شده از سلول های لکوسیتی خون محیطی بر روی ژل آگارز ۱,۵ درصد. باندهای شارپ نشانگر انجام صحیح مراحل استخراج DNA است.



نتایج مربوط به تعیین ژنوتیپ به روش مولکولی TETRA-Primer ARMS-PCR بر روی DNA استخراج شده جهت تعیین پلی مورفیسم rs1800624 ژن AGER در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، با توجه به نوع پرایمرهای طراحی شده، محصولات PCR با اندازه های ۴۹۶، ۳۹۳ و ۱۵۵ جفت بازی تعیین‌کننده ژنوتیپ هتروزیگوت (AT) است. محصولات PCR با اندازه های ۴۹۶ و ۱۵۵ جفت بازی تعیین‌کننده ژنوتیپ هوموزیگوت جهش یافته (AA) و محصولات PCR با اندازه های ۴۹۶ و ۳۹۳ جفت بازی تعیین‌کننده ژنوتیپ هوموزیگوت وحشی (TT) است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]



شـــکل ۳. نتایج مربوط به ژنوتایپینگ انجام شـــده به روش TETRA-Primer ARMS-PCR بر روی DNA اســـتخراج شـــده جهت تعیین پلی مورفیســـم rs1800624 ژن AGER. ســـتون ۱؛ DNA مارکر ۵۰ جفت بازی. ســـتون ۲؛ باندهای مربوط به محصـــولات PCR با اندازه های ۴۹۶، ۳۹۳ و ۱۵۵ جفت بازی (ژنوتیپ هتروزیگوت). ستون ۳؛ باندهای مربوط به محصولات PCR با اندازه های ۴۹۶ و ۳۹۳ جفت بازی (ژنوتیپ هوموزیگوت وحشی). ستون ۴؛ باندهای مربوط به محصـــولات PCR با اندازه های ۴۹۶ و ۱۵۵ جفت بازی (ژنوتیپ هوموزیگوت جهش یافته).

نتایج مربوط به آزمون HWE نشـان داد که پلی مورفیســم rs1800624 ژن AGER در گروه کنترل در تعادل بود؛ اما برای گروه بیمار این تعادل برقرار نبود (جدول ۲).

جدول ۲: بررسی تعادل هاردی واینبرگ (HWE) در گروه های کنترل و بیمار برای مارکر rs1800624. با توجه به نتایج جدول زیر، مارکر rs1800624، برای گروه کنترل در تعادل بود؛ اما برای گروه بیمار در تعادل نبود.

SNP Marker	HWE for Case (p-value)	HWE for Control (p-value)
rs1800624	0.0231	0.119

توزیع و فراوانی آلـل هـا و ژنوتیـپ هـای پلی مورفیســم rs1800624 در هر دو گروه بیمـار و کنترل در جـدول ۳ نشـان داده اسـت. نتایج این مطالعه نشـان می دهد که ارتباط معنی‌داری بین گروه بیمـار و کنترل برای الـل هـا و ژنو تیپ های این پلی مورفیســم وجود ندارد. هرچند به نظر می‌رسد ژنوتیپ AA پلی مورفیسم مذکور با ریسک افزایش یافته بیماری نفرو پاتی د یابتی (OR=1.889, 95% CI: 0.454-7.854) و ژنوتیـپ TT نقش محـافظتی در برابر ایجاد بیماری ارتباط داشته باشد (OR=0.708, 95% CI: 0.342-1.465). همچنین نتایج مربوط به آنالیز آلل ها نشان داد الل A این پلی مورفیسم ممکن ا ست با افزایش ریسک ایجاد نفرو پاتی مرتبط باشـــد (OR=1.452, 95% CI: 0.783-2.695) و آلل T نقش محافظتی داشته باشد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

جدول ۳. فراوانی آلل ها و آنالیز همبستگی پلی مورفیسم rs1800624 ژن AGER در گروه های بدون نفروپاتی دیابتی و با نفروپاتی دیابتی.

مارکر	آلل یا ژنوتیپ	فراوانی افراد دیابتی بدون نفروپاتی	فراوانی افراد دیابتی با نفروپاتی	نسبت شانس (OR) (CI ۹۵٪)	ژنوتیپ_2DF (p-value)
rs1800624	A	۳۱٪	۲۶٪	۱/۴۵۲ (۰/۲-۷۸۳/۶۹۵)	-
	T	۶۹٪	۷۴٪	۰/۶۸۹ (۰/۱-۳۷۱/۲۷۸)	
	AA	۶(۸/۵٪)	۴(۵/۱٪)	۱/۸۸۹ (۰/۷-۴۵۴/۸۵۴)	۰/۵۵۶
	AT	۳۲(۴۵/۱٪)	۳۳(۴۱/۸٪)	۱/۲۲۱ (۰/۲-۵۵۶/۶۸۳)	
	TT	۳۳(۴۶/۵٪)	۴۲(۵۳/۲٪)	۰/۷۰۸ (۰/۱-۳۴۲/۴۶۵)	

بحث

نتایج مربوط به توزیع و فراوانی ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs1800624 در ژن AGER در هر دو گروه بیماران دیابتی با نفروپاتی و بیماران دیابتی بدون نفروپاتی نشان داد که ارتباط معنی داری بین دو گروه وجود ندارد. هرچند به نظر می رسد ژنوتیپ AA (با فراوانی ۵/۱ درصد) با ریسک افزایش یافته بیماری نفروپاتی مرتبط باشد. همچنین نتایج مربوط به آنالیز آلل ها نشان داد الل A (با فراوانی ۲۶ درصد در مقابل ۳۱ درصد برای گروه غیر نفروپاتی دیابتی) پلی مورفیسم ممکن است با ریسک افزایش یافته ایجاد نفروپاتی مرتبط باشد(OR=1.452) ، گرچه نتایج به طور کلی از لحاظ آماری معنی دار نبود؛ اما ممکن است در حجم های بالاتر تعداد نمونه احتمال ایجاد نفروپاتی دیابتی افزایش یابد، از سوی دیگر نتایج تفکیکی این مطالعه با نتایج سایر مطالعات قبلی متناقض و در عین حال جالب توجه است که می تواند محرک انجام مطالعات جامع تر جهت دستیابی به نتایج محکم تر در جهت تائید یا رد آن است. مطالعه بر روی جمعیتی از هند نشان داد که پلی مورفیسم rs1800624 به طور معنی داری با ایجاد دیابت نوع دو مرتبط بوده و از سوی دیگر باعث کاهش ریسک ایجاد آسیب های ماکروواسکولار در بیماران دیابت نوع دو می گردد. گزارش مذکور همچنین بیان می کند که این پلی مورفیسم ارتباط معنی داری با عوارض میکروواسکولار در بیماران دیابتی ندارند (۲۲)؛ که از این لحاظ تا حدود زیادی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. یک مطالعه متاآنالیز بر روی دو پلی مورفیسم rs1800624 و rs1800625 در ژن AGER که تنها به ترتیب بر اساس چهار و شش مقاله در دسترس صورت گرفت و جمعیت محدودی را پوشش می‌داد نشان داد که بین پلی مورفیسم rs1800625 و ایجاد نفروپاتی دیابتی ارتباط معنی داری وجود دارد که ژنوتیپ CC یک فاکتور خطر احتمالی برای آن است؛ اما ممکن است ارتباطی بین پلی مورفیسم rs1800624 و ایجاد نفروپاتی دیابتی وجود نداشته باشد (۲۳)؛ اما با توجه به اینکه این مطالعه متاآنالیز با محدودیت هایی مواجه بود از جمله اینکه تنها بیماران دیابتی نوع دو در جمعیت قفقازی ها را در برمی‌گرفت و سایر گروه‌های نژادی از قبیل جمعیت‌های آسیایی و آفریقایی را در بر نمی‌گرفت؛ بنابراین نتایج حاصل، نمی توانست با قوت مورد تائید قرار گیرد؛ لذا لازم بود که مطالعات بیشتری در سایر گروه های نژادی نیز صورت گیرد. از جمله اینکه مطالعه ما نشان داد که ممکن است سهم های ژنتیکی و محیطی خطر بیماری در یک گروه جغرافیایی و نژادی خاص، نتایج متفاوت از سایر جمعیت های مطالعه شده مذکور نشان دهد که می‌تواند تائید کننده این موضوع باشد که نفروپاتی دیابتی یک بیماری با اتیولوژی چند فاکتوری است و پلی مورفیسم های یک ژن به تنهایی در ایجاد نفروپاتی دیابتی یا محافظت در برابر ایجاد

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

آن مؤثر نیستند و یا حتی ممکن است نتایج متضاد را نشان دهند.

مطالعه دیگری بر روی یک جمعیت سوئدی نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم rs1800624 و خطر نفروپاتی دیابتی وجود دارد (۲۴). همچنین در یک مطالعه آینده نگر، مشخص شد این پلی مورفیسم در جمعیت ایتالیایی با کاهش سریع عملکرد کلیوی در بیماران کلیوی مزمن مرتبط است که تا حدودی قابل مقایسه با مطالعه ما است (۲۵)، در حالی که همین پلی مورفیسم در جمعیتی از فنلاند دارای اثر محافظت‌کنندگی در برابر پیشرفت اختلالات کلیوی و دفع آلبومین بود (۲۶) که به طور نسبی با مطالعه حاضر در تناقض است. مطالعه بر روی یک جمعیت هلندی نشان داد علاوه بر نفروپاتی دیابتی، ارتباط بین پلی مورفیسم های 2184A/G، 374T/A- و 429T/C- با کاهش عملکرد کلیوی وجود دارد (۲۷). نتایج مطالعات انجام شده بر روی دو گروه از سفیدپوستان و سیاه پوستان برزیلی (۲۸) و نیز بر روی جمعیت مالزیایی (۲۰) در ارتباط با پلی مورفیسم مورد مطالعه نشان داد که ارتباطی با نفروپاتی دیابتی و اختلالات مزمن کلیوی ندارد که تطابق بیشتری با نتایج مطالعه ما نشان می دهد. معیار مطالعه دوم در تعیین اختلال مزمن کلیوی نیز مشابه با مطالعه حاضر، میزان eGFR پایین‌تر از $60\ ml/min/1.73\ m^2$ بود (۲۰) که می‌تواند عاملی برای تطابق بیشتر نتایج دو مطالعه باشد. یکی از روش های تشخیص نفروپاتی دیابتی در مراحل اولیه در بیماران با دیابت نوع دو، تعیین میکروآلبومینوری است (۱۶)؛ اما با توجه به اینکه مشاهده شده است که در درصد قابل توجهی از بیماران با وجود پیشرفت اختلال کلیوی، نرموآلبومینوری وجود دارد (۲۹, ۳۰)؛ بنابراین عدم توجه به این امر ممکن است باعث ایجاد اشکال در تشخیص صحیح و طبقه بندی و تعیین مرحله پیشرفت بیماری و نهایتاً باعث ایجاد نتایج متفاوتی در ژنوتایپینگ در بین مطالعات مختلف گردد که این امر بر تفسیر نتایج تأثیرگذار خواهد بود. به همین علت در مطالعه حاضر به‌جای استفاده از معیار AER، از تعیین eGFR در شناسایی نفروپاتی دیابتی استفاده گردید. در مجموع توضیح قابل قبولی که برای این اختلاف در نتایج می توان ارائه داد، تفاوت‌های منطقه‌ای و نژادی بین جمعیت ایران و سایر جمعیت ها است. گرچه در ایران نیز نژادهای مختلفی از جمله فارس، ترک، کرد و عرب وجود دارد و در این مطالعه، در مجموع جمعیت ایرانی (سفید پوست) مدنظر بوده و مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مرتبط، با اطمینان نمی‌توان این پلی مورفیسم را به عنوان مارکری برای نفروپاتی دیابتی به عنوان یک بیماری با اتیولوژی چند فاکتوری، تائید و یا رد کرد و برای حصول نتایج مطمئن تر، نیاز به طراحی مطالعات آینده نگر با در نظر گرفتن وضعیت پیشرفت بیماری و سنجش شاخص‌های دیگر مانند سطح سرمی پروتئین AGER و اندازه جمعیت مورد مطالعه با تعداد نمونه بیشتر جهت روشن تر شدن ژنتیک نفروپاتی دیابتی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت تحقیقات و فناوری و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به خاطر تأمین بودجه این طرح و از کارکنان آزمایشگاه‌های بیوشیمی و بیمارستان رازی قزوین و نیز همه بیمارانی که در این طرح پژوهشی مشارکت داشتند صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نماید. در نهایت به استحضار می رساند که هیچ کدام از نویسندگان این مقاله تعارض منافعی برای انتشار آن ندارند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

منابع

1. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Smidt UM, Parving HH. Progression of diabetic nephropathy. Kidney Int. 2001;59(2):702-9.
2. Pezzolesi MG, Poznik GD, Mychaleckyj JC, Paterson AD, Barati MT, Klein JB, et al. Genome-wide association scan for diabetic nephropathy susceptibility genes in type 1 diabetes. Diabetes. 2009;58(6):1403-10.
3. Kassaee SM, Goodarzi MT, Oshaghi E. Antioxidant, antiglycation and anti-hyperlipidemic effects of Trigonella foenum and Cinnamon in type 2 diabetic rats. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2018;13(1),e38414.
4. Oesterle A, Bowman MA. S100A12 and the S100/Calgranulins: Emerging Biomarkers for Atherosclerosis and Possibly Therapeutic Targets. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35(12): 2496-507.
5. Pickering RJ, Tikellis C, Rosado CJ, Tsorotes D, Dimitropoulos A, Smith M, et al. Transactivation of RAGE mediates angiotensin-induced inflammation and atherogenesis. J Clin Invest. 2019;129(1):406-421.
6. Chen YJ, Chan DC, Chiang CK, Wang CC, Yang TH, Lan KC, et al. Advanced glycation end-products induced VEGF production and inflammatory responses in human synoviocytes via RAGE-NF-kappaB pathway activation. J Orthop Res. 2016;34:791-800.
7. Moridi H, Karimi J, Sheikh N, Goodarzi MT, Saidijam M, Yadegarazari R, et al. Resveratrol-Dependent Down-regulation of Receptor for Advanced Glycation End-products and Oxidative Stress in Kidney of Rats With Diabetes. Int J Endocrinol Metab. 2015;13:e23542.
8. Jazaeri A., Karimi Moghadam A., Vallian Borujeni S. Evaluating the Association between Rs1800624 in Rage Gene and Multiple Sclerosis in Isfahan Population. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci. 2016; 23 (10): 923-931.
9. udson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. Diabetes. 2001;50:1505-1511.
10. Reiniger N, Lau K, McCalla D, Eby B, Cheng B, Lu Y, et al. Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic OVE26 mouse. Diabetes. 2010;59:2043-2054.
11. Myint KM, Yamamoto Y, Doi T, Kato I, Harashima A, Yonekura H, ET AL. RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin. Diabetes. 2006;55:2510-2522.
12. Ying Zhang, Nan Jia, Feng Hu, Naijun Fan, Xiaohua Guo, Han Du, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in the RAGE gene and its gene- environment interactions with diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. Oncotarget. 2017;8(57):96885-96892. doi: 10.18632/oncotarget.18785.
13. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2014;37:S81-S90.
14. Morizawa Y, Satoh H, Iwasa S, Sato A, Aoki Y, Hamada R. Clinical Accuracy of Average Creatinine and Cystatin-C-Based Estimated GFR in Japanese Living Renal Transplantation Donors. Transplant Proc. 2020;52(10):3017-3022.
15. Ramalingam S, Karuppiah M, Thiruppathi M, Palanivelu S, Panchanatham S. Antioxidant potential of biflavonoid attenuates hyperglycemia by modulating the carbohydrate metabolic enzymes in high fat diet/streptozotocin induced diabetic rats. Redox Rep. 2020;25(1):1-10.
16. Satirapoj B, Adler SG. Prevalence and Management of Diabetic Nephropathy in Western Countries. Kidney Dis (Basel). 2015;1(1):61-70.
17. Abbasi-Oshaghi E, Mirzaei F, Mirzaei A. Effects of ZnO nanoparticles on intestinal function and structure in normal/high fat diet-fed rats and Caco-2 cells. Nanomedicine (Lond). 2018;13(21):2791-2816.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]

18. Antonaros F, Olivucci G, Cicchini E, Ramacieri G, Pelleri MC, Vitale L, et al. MTHFR C677T polymorphism analysis: A simple, effective restriction enzyme-based method improving previous protocols. Mol Genet Genomic Med. 2019;7(5):e628.
19. Song X, Li J, Fei P, Zhang X, Pan C, Chen H, et al. Polymorphisms within the Boule Gene Detected by Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System PCR (T-ARMS-PCR) are Significantly Associated with Goat Litter Size. Animals (Basel). 2019;9(11):910.
20. Ng ZX, Kuppusamy UR, Tajunisah I, Fong KC, Chua KH. Association analysis of -429T/C and -374T/A polymorphisms of receptor of advanced glycation end products (RAGE) gene in Malaysian with type 2 diabetic retinopathy. Diabetes Res Clin Pract. 2012;95:372-377.
21. Xie L, Deng Y, Yuan Y, Tan X, Liu L, Li N, et al. Association of SNP rs1867277 in FOXE1 Gene and Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Han Chinese Population. Fetal Pediatr Pathol. 2018;37:89-94.
22. Martens HA, Nienhuis HL, Gross S, van der Steege G, Brouwer E, Berden JH, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and disease severity in lupus nephritis. Lupus. 2012;21(9):959-68.
23. Shi Z, Lu W, Xie G. Association between the RAGE gene -374T/A, -429T/C polymorphisms and diabetic nephropathy: a meta-analysis. Ren Fail. 2015;37(5):751-756.
24. Lindholm E, Bakhtadze E, Sjogren M, Cilio CM, Agardh E, Groop L, et al. The -374 T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients. Diabetologia. 2006;49:2745-2755.
25. Baragetti I, Norata GD, Sarcina C, Baragetti A, Rastelli F, Buzzi L, et al. -374 T/A RAGE polymorphism is associated with chronic kidney disease progression in subjects affected by nephrocardiovascular disease. PLoS One. 2013 4;8(4):e60089.
26. Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI, Perola M, Grant PJ, Groop PH. The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. Diabetes. 2003;52:891-894.
27. Tripathi AK, Chawla D, Bansal S, Banerjee BD, Madhu SV, Kalra OP. Association of RAGE gene polymorphism with vascular complications in Indian type 2 diabetes mellitus patients. Diabetes Res Clin Pract. 2014;103:474-481.
28. Dos Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Pires Souto KE, Roisenberg I. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes. Mol Genet Metab. 2005;85:149-156.
29. Chen C, Wang C, Hu C, Han Y, Zhao L, Zhu X, et al. Normoalbuminuric diabetic kidney disease. Front Med. 2017;11:310-318.
30. Li A, Yi B, Liu Y, Wang J, Dai Q, Huang Y, et al. Urinary NGAL and RBP Are Biomarkers of Normoalbuminuric Renal Insufficiency in Type 2 Diabetes Mellitus. J Immunol Res. 2019;2019:5063089.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.52547/sjku.27.3.1]