دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

دررشته بیوشیمی

دانشکده علوم پایه

گروه علمی بیوشیمی

عنوان پایان نامه:

بررسی پلی مورفیسم ژن TAP-2 در دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ در بیماران مبتلا به دیابت تیپ 1 در جمعیت خراسان

اساتید راهنما:

دکتر هوشنگ رفعت پناه

دکتر جلیل توکل افشار

استاد مشاور:

دکتر مسعود صالح مقدم

نگارش:

نرگس نظامدوست

آبان ۸۸

بررسی پلی مورفیسم ژن TAP-2 در جایگاه های ٥٦٥ و ٦٦٥
در بیماران مبتلا به دیابت تیپ 1 در جمعیت خراسان

مقدمه:

دیابت میلتوس تیپ 1، بیماری خودایمنی است که با ژنهای که در منطقه HLA (human leucocyte antigen) روی کرموزوم ٦ قرا ر دارند در ارتباط است. اساسا عرضه آنتی ژن HLA کلاسI اثـر منفـی بر روی دیابـت تیـپ1 دارد. ناقـل هـای TAP-1(Transporter Associated With Antigen Processing-1) و TAP-2 انتقال پپتیدهای آنتی ژنی را به شبکه آندوپلاسمی وسـاطت مـی کننـد،و ایـن ژنهـا بـر روی موقعیت HLA کلاس II قرار دارند، که ممکن است فاکتور بالقوه ای بـرای اسـتعداد ابـتلا بـه دیابـت میلتوس تیپ1 باشند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن TAP-2 در جایگاه های ٥٦٥ و٦٦٥ با استعداد ابتلا به دیابت تیپ1 می باشد.

روش کار:

ژنوتیپ TAP-2 در گروه مورد مطالعه شامل ٨٧ فرد مبتلا به دیابت تیپ1 و ١٠٠ فرد کنترل سـالم ایرانی تعیین شد. نتایج پلی مورفیسم TAP-2 در جایگاه های ٥٦٥ و٦٦٥ توسـط تکنیـک tetra primer ARMS-PCR ارزیابی شد. داده ها با استفاده از تست chi-square test و Fisher's exact test مورد بررسـی قرار گرفت.

نتایج:

فراوانی آللی بین بیماران T1DM(Diabets Mellitus Type1) و افراد کنترل مقایسه شدند. در فراونـی ژنوتیپ ، فنوتیپ و توزیع آللی در دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ ، ژن TAP-2 بین افراد کنترل سـالم و بیمـار اختلاف معناداری وجود نداشت(p valu>٠/٠٥).

نتیجه گیری:

احتمالا TAP-2 نمی تواند ارتباط قوی با استعداد ابتلا به دیابت تیپ1 داشته باشد که با مطالعـات چندین جمعیت دیگر نیز مطابقت می کند. و فاکتورهای ژنتیکی متعددی ممکن است در استعداد ابتلا به دیابت تیپ1 نقش داشته باشد. بنابراین مطالعه حاضر پیشنهاد می کند که احتمالا پلی مورفیسم ژن TAP-2 نمی تواند یک فاکتور مهم در استعداد ابتلا به دیابت تیپ1 در جمعیـت ایـران باشـد و بـرای تعیین نقشی که پلی مورفیسم ژن TAP-2 دراستعداد ابتلا به دیابت تیپ1 دارد، نیاز به مطالعات بیشتری در جمعیت های مختلف می باشد.

واژه های کلیدی: T1DM،ARMS-PCR ، TAP-2 ، HLA- II

فهرست مطالب

فصل اول.مقدمه ۱

۱-۱) پیشگفتار ۲

۱-۱-۱) معرفی پایان نامه و مسئله تحقیق ۲

۱-۱-۲) اهداف ۳

۱-۱-۲-۱) اهداف کلی ۳

۱-۱-۲-۲)اهداف اختصاصی ۳

۱-۱-۳) فرضیات و سوالات تحقیق ٤

۱-۱-٤) روش اجرای پایان نامه ٤

۱-۱-۵) واژه های کلیدی ۵

۱-۱-٦) نوع تحقیق ٦

۱-۱-۷) شیوه گردآوری اطلاعات ٦

۱-۱-۸) متغیرها ٦

۱-۱-۹) نحوه تجزیه و تحلیل داده ها و روش آماری ٦

۱-۱-۱۰) بررسی متون ۷

۱-۲) کلیات ۸

۱-۲-۱) دیابت میلتوس (DM) ۸

۱-۲-۱-۱) تعریف ۸

۱-۲-۱-۲)طبقه بندی ۸

۱-۲-۲)دیابت شیرین نوع1 (T1DM) ۹

۱-۲-۲-۱)اپیدمیولوژی ۱۱

۱-۲-۲-۲)اتیولوژی ۱۱

۱-۲-۲-۳) عوامل ژنتیکی ۱۲

۱-۲-۲-٤)عوامل خود ایمنی ۱۵

۱-۲-۲-۵)نشانگرهای ایمونولوژیک ۲۰

۱-۲-۲-٦)عوامل محیطی ۲۱

۱-۲-۲-۷)فیزیولوژی..... ۲۲
۱-۲-۲-۸)تشخیص ۲۲
۱-۲-۲-۹)بیوسنتز انسولین..... ۲۳
۱-۲-۲-۱۰)ترشح انسولین..... ۲٤
۱-۲-۲-۱۱)عملکرد انسولین..... ۲۵
۱-۲-۲-۱۲)پیش گیری از دیابت میلتوس نوع1A..... ۲۷
۱-۲-۲-۱۳)علایم..... ۲۸
۱-۲-۲-۱۳-۱)هیپرگلیسمی..... ۲۸
۱-۲-۲-۱۳-۲)پلی اوری ۲۸
۱-۲-۲-۱۳-۳)پلی دیپسی ۲۸
۱-۲-۲-۱۳-٤)پلی فاژی ۲۸
۱-۲-۲-۱۳-۵)کتواسیدوز..... ۲۹
۱-۲-۲-۱۳-٦)هیپرلیپمی..... ۲۹
۱-۲-۲-۱۳-۷)از دست دادن پروتئین ۳۰
۱-۲-۲-۱۳-۸)از دست دادن الکترولیت..... ۳۰
۱-۲-۲-۱٤)عوارض حاد..... ۳۰
۱-۲-۲-۱۵)عوارض مزمن..... ۳۰
۱-۲-۲-۱۵-۱)مکانیسم بروز عوارض..... ۳۱
۱-۲-۲-۱۵-۲)عوارض افتالمولوژیک..... ۳۲
۱-۲-۲-۱۵-۳)عوارض کلیوی..... ۳۳
۱-۲-۲-۱۵-٤)نوروپاتی ۳۳
۱-۲-۲-۱۵-۵)پلی نوروپاتی/ منونوروپاتی ۳۳
۱-۲-۲-۱۵-٦)پلی رادیکولوپاتی..... ۳٤
۱-۲-۲-۱۵-۷)منونوروپاتی ۳٤
۱-۲-۲-۱۵-۸)نوروپاتی اتونوم..... ۳٤
۱-۲-۲-۱۵-۹)اختلال عملکرد گوارشی و ادرای-تناسلی..... ۳٤

۱-۲-۲-۱۵-۱۰)عوارض قلبی- عروقی..... ۳۵
۱-۲-۲-۱۵-۱۱)عوارض اندام تحتانی..... ۳۵
۱-۲-۲-۱۵-۱۲)عفونتها..... ۳۶
۱-۲-۲-۱۵-۱۳)تظاهرات پوستی..... ۳۶
۱-۲-۲-۱۶)وضعیت تغذیه..... ۳۶
۱-۲-۲-۱۷)ورزش..... ۳۷
۱-۲-۲-۱۸)درمان..... ۳۷
۱-۳) ناقل پردازش آنتی ژنی(TAP)..... ۳۹
۱-۳-۱) پردازش وعرضه آنتی ژن..... ۳۹
۱-۳-۱-۱) مسیر اندوسیتیک..... ۳۹
۱-۳-۱-۲) مسیر سایتوزولیک..... ۴۰
۱-۳-۲) نقش و عملکرد TAP..... ۴۳
۱-۳-۳) ژنتیک TAP..... ۴۴
۱-۳-۴) ساختمان مولکولیTAP..... ۴۶
۱-۳-۵) ابرخانواده ABC..... ۴۸
۱-۳-۶) تعدیل بیانTAP..... ۴۸
۱-۳-۷) گزینش پپتید..... ۵۰
۱-۳-۸) مکانیسم انتقال پپتید..... ۵۲
۱-۳-۹) ارتباط پلی مورفیسم TAP بابیماریهای اتو ایمیون و کمبودایمنی..... ۵۵
۱-۳-۱۰) ارتباط پلی مورفیسم TAP با رد پیوند..... ۵۶
۱-۳-۱۱) ارتباط TAP با بیماریهای ژنتیکی..... ۵۶
۱-۳-۱۲) ارتباط TAP با سرطان..... ۵۷
۱-۳-۱۳) ارتباط TAP با عفونتهای ویروسی..... ۵۸
۱-۴) پلی مورفیسم های ژنتیکی..... ۶۲
۱-۴-۱)موتاسیون ژنتیکی..... ۶۲
۱-۴-۲) انواع پلی مورفیسم..... ۶۲

۱-٤-۳) پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ٦٣
۱-٤-٤) توزیع SNP ها ٦٤
۱-٤-٥) SNP های ناحیه کد کننده ٦٤
۱-٤-٦) کاربرد پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی ٦٤
۱-٤-۷) روش های شناسایی جهش های نا شناخته ٦٥
۱-٤-۷-۱) Denaturing Gradiant Gel ElectroPhoresis (DGGE) ٦٥
۱-٤-۷-۲)Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ٦٦
۱-٤-۸) روش های شناسایی جهش های معلوم ٦٧
۱-٤-۸-۱) Amplification Refractory Mutation System (ARMS) ٦٧
۱-٤-۸-۱-۱) طراحی آغازگر ARMS ٦٨
۱-٤-۸-۲) هیبریداسیون الیگونوکلئوتید اختصاصی آلل (ASO) با فرآورده های ثابت شده PCR- دات بلات ٦٩
۱-٤-۸-۳) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ۷۰
۱-٥) واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ۷۱
۱-٥-۱)مکانیسم PCR ۷۲
۱-٥-۲) عوامل مورد نیاز برای انجام واکنش PCR ۷۲
۱-٥-۲-۱)آنزیم DNA پلیمراز(Taq DNA polymerase) ۷۳
۱-٥-۲-۲) دی اکسی نوکلئیدتری فسفات (dNTPs) ۷٤
۱-٥-۲-۳) بافر PCR ۷٤
۱-٥-۲-٤)$MgCl_2$ ۷٥
۱-٥-۲-٥) پرایمر ۷٥
فصل دوم.مروری برمطالعات گذشته ۷۷
۲-۱) توزیع هاپلوتایپهای **TAP-2** در جوامع مختلف ۷۸
۲-۲) ارتباط پلی مورفیسم و توزیع آللی **TAP-2** با دیابت تیپ**1** ۸٤
۲-۳) ارتباط پلی مورفیسم و توزیع آللی **TAP-2** باسایربیماریهای اتوایمیون ۸٦
فصل سوم.مواد و روش ها ۹۲

۳-۱)جمع آوری بیماران ۹۳
۳-۲)استخراج DNA (روش Salting out) ۹٤
۳-۲-۱)وسایل مورد نیاز ۹٤
۳-۲-۲) معرفهای مورد نیاز ۹۵
۳-۲-۳) طرز تهیه محلول های استخراج DNA ۹۵
۳-۲-٤)روش آزمایش ۹٦
۳-۳)معرفی و مکانیسم تکنیک Tetra primers ARMS- PCR ۹۸
۳-۳-۱)روش کار ۱۰۱
۳-۳-۲)آشکارسازی و تجزیه و تحلیل محصول PCR ۱۰٤
۳-۳-۲-۱) مواد و محلول های مورد نیاز الکتروفورز ۱۰۵
۳-۳-۲-۲) روش کار ۱۰٦
۳-٤) آنالیز آماری و بیان نتایج: ۱۰۹
فصل چهارم.نتایج ۱۰۸
٤-۱) مقدمه ۱۰۹
٤-۲)یافته ها ۱۱۱
٤-۲-۱)تعیین ژنوتیپ ۱۱۲
٤-۳) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ جایگاه ٥٦٥ ژن TAP-2 بااستعداد ابتلا به دیابت تیپ1 ..... ۱۱٦
٤-٤) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ جایگاه ٦٦٥ ژن TAP-2 با استعداد ابتلا به دیابت تیپ1 ..... ۱۱۷
٤-٥) بررسی ارتباط بین فراوانی آللهایTAP-2 و ابتلا به دیابت تیپ1 ..... ۱۱۸
٤-٦) بررسی ارتباط بین آللهای ترکیبی TAP-2 و ابتلا به دیابت تیپ1 ..... ۱۱۹
٤-۷) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ ژن TAP-2با سن ۱۲۱
٤-۸) بررسی ارتباط فراوانی آللی و آللهای ترکیبی TAP-2 با سن ۱۲۱

٤-٩) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ ژن **TAP-2** با سن افراد در گروه بیمار ١٢٢
٤-١٠) بررسی ارتباط فراوانی آللی و آللهای ترکیبی **TAP-2** با سن افراد در گروه بیمار ١٢٢
٤-١١) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ ژن **TAP-2** با سن افراد در گروه کنترل ١٢٣
٤-١٢) بررسی ارتباط فراوانی آللی و آللهای ترکیبی **TAP-2** با سن افراد در گروه کنترل ١٢٣
٤-١٣) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ ژن **TAP-2** با سن شروع دیابت ١٢٤
٤-١٤) بررسی ارتباط فراوانی آللی و آللهای ترکیبی **TAP-2** با سن شروع دیابت ١٢٤
٤-١٥) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ در جایگاه ٥٦٥ با جایگاه ٦٦٥ ژن **TAP-2** ١٢٥
٤-١٦) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ ژن **TAP-2** با جنس افراد ١٢٦
٤-١٧) بررسی ارتباط فراوانی آللی و آللهای ترکیبی **TAP-2** با جنس افراد ١٢٧
٤-١٨) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ ژن **TAP-2** با جنس افراد در گروه بیمار ١٢٩
٤-١٩) بررسی ارتباط فراوانی آللی و آللهای ترکیبی **TAP-2** با جنس افراد در گروه بیمار ١٣٠
٤-٢٠) بررسی ارتباط فراوانی ژنوتیپ و فنوتیپ دو جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ ژن **TAP-2**با جنس افراد در گروه کنترل ١٣٢
٤-٢١) بررسی ارتباط فراوانی آللی و آللهای ترکیبی **TAP-2** با جنس افراد در گروه کنترل ١٣٤
فصل پنجم.بحث و نتیجه گیری ١٣٦
٥-١) بحث و نتیجه گیری ١٣٧

منابع و مواخذ ۱٤٤
پیوست ۱٤۹

فصل اول:

مقدمه

۱-۱) پیشگفتار

۱-۱-۱) معرفی پایان نامه و مسئله تحقیق

دیابت میلتوس تیپ1[1] یک بیماری خود ایمنی با واسطه سلولهای T است که با تخریب انتخابی سلولهای بتا در پانکراس مشخص می شود. مهمترین ژنهای مولد بیماری روی کروموزوم ٦ قرار دارند. برخی از این ژنها و نوع تغییر ژنتیکی آنها شناسایی شده اند اما هر روز بر تعداد ژنها و جایگاه هایی که احتمال می رود تغییرات ژنتیکی آنها با ایجاد یا پیشرفت بیماری ارتباطی داشته باشند افزوده می شود. یکی از این ژنها TAP-2[2] است. ژنهای TAP-1 و TAP-2 هترودایمری را کد می کنند که روی غشا شبکه آندوپلاسمیک کانالی را تشکیل می دهد که پپتیدهای تجزیه شده توسط پروتئازم را از سیتوپلاسم به داخل شبکه آندوپلاسمیک پمپ می کند. مولکولهای TAP در سمت مجرای غشا شبکه آندوپلاسمیک بطور غیر کووالان بواسطه پروتئینی بنام تاپاسین به مولکولهای تازه ساز MHC-I[3] متصل هستند. مولکولهای TAP پپتیدهای منتقل شده را به مولکولهای تازه ساز MHC- I متصل می کنند تا به سلولهای T سیتوتوکسیک عرضه شوند. ژنهای TAP پلی مورفیک هستند و پلی مورفیسم آنها در انتخاب پپتیدهای اپی توپ از جمله اتو آنتی ژنها اثر می گذارند. انتخاب پپتید توسط مولکولهای TAP ممکن است به جایگاههایی در داخل این پپتیدها وابسته باشد، بنابراین نقش TAP-2 در بروز دیابت تیپ 1 به احتمال زیاد به انتخاب ویژه ای از پپتید (اتوآنتی ژن) مربوط می شود که به جایگاههای ۷،٦،۳،۲ و همچنین انتهای **C**–ترمینال در TAP-2 متصل می شوند. در این مطالعه با توجه به اهمیت اثبات این ارتباط که در مقالات معتبر علمی به آن پرداخته شده است، پلی مورفیسم ژن TAP-2 در ۲ جایگاه ٥٦٥ و ٦٦٥ در بیماران مبتلا به دیابت تیپ 1 مورد بررسی قرار خواهد گرفت[۱].

پلی مورفیسم ژن ها برای مقاصد مختلفی چون تعیین حساسیت یا مقاومت نسبت به بیماری ها، مطالعات تبارشناسی ، تعیین الگوی مهاجرت ها وتعیین زمینه ژنتیکی یک جامعه مورد مطالعه قرار می گیرند.

تعیین پلی مورفیسم ژن TAP-2 نیز در رابطه با بیماری های مختلف از جمله آرتریت روماتوئید، لوپوس اریتماتوزیس سیستمیک ،اسکیزوفرنی، آنکیلوزینگ اسپاندیلیت، آرتریت، درماتیت آتوپیک ،

---

[1] Diabets Mellitus Type1
[2] Transporting Associated with Antigen Processing 2
[3] Major Histocompatibility Complex

آستما، مولتیپل اسکلروزیز ، آنفروپاتی آنتی ژن وگریوز انجام شده است[۱].

TAP پروتئینی است دو قسمتی که از دو زیر واحد غیرهمسان تشکیل شده است. ژن های مربوطه بر روی کروموزوم ٦ و بین HLA -DQ[1] و HLA -DP قرار گرفته است. پروتئین های TAP پس از پردازش آنتی ژن در سیتوزول در انتقال آن به غشا رتیکولوم اندوپلاسمیک و اتصال آن به شیار MHC-1 عمل می کند. همانند HLA و در ارتباط تنگاتنگ با آن بر روی پاسخ ایمنی به آنتی ژن های پردازش شونده تاثیر می گذارد. این ژن ها هم همانند HLA در افراد مختلف دارای پلی مورفیسم اند که این پلی مورفیسم بر روی چگونگی فعالیت آنها مؤثر است به ویژه در انتخاب پپتیدهای اپی توپ از جمله اتو آنتی ژنها تاثیر دارد[۱].

دیابت بیماری ژنتیکی شایعی است که تشخیص به موقع آن در گروههای پر خطر، یعنی افرادی که سابقه مثبت فامیلی دیابت دارند، شناسایی سریع بیماران و درمان درست آنها، مستلزم شناخت اساس ژنتیکی بیماری است. TAP-2 یکی از ژنهای مطرح در بروز بیماری است. در صورت اثبات وجود پلی مورفیسم این ژن در جمعیت بیماران دیابتی ما، می توان از این تست، جهت شناسایی افرادی که سابقه مثبت بیماری را دارند اما هنوز علامتدار نشده اند استفاده کرد. در برخی موارد تشخیص به موقع دیابت تیپ 1 و انتخاب درمان مناسب برای بیمار تنها با کمک علایم بالینی ممکن نیست ودر نهایت بر اساس ظن بالینی تصمیم گرفته می شود. در چنین مواردی استفاده از روشهای ژنتیکی ، بسیار کمک کننده است.

موفقیت یا عدم موفقیت بسیاری از سیاست های بهداشتی کلان که در کشور اجرا شده یا در حال اجرا است بستگی فراوانی به زمینه ژنتیکی افراد بیمار و از جمله ژن TAP دارد. این امر همانگونه که ذکر شد در اتخاذ تصمیمات بهداشتی راهنمای تصمیم گیران خواهد بود.

۱-۱-۲) اهداف

۱-۱-۲-۱) اهداف کلی

تعیین ارتباط پلی مورفیسم ژن TAP-2 در جایگاههای ٥٦٥ و ٦٦٥ با بیماری دیابت تیپ1

۱-۱-۲-۲)اهداف اختصاصی

۱. تعیین پلی مورفیسم ژن TAP-2 در کدون ٥٦٥ (GCT→ACT, Ala→Thr) در بیماران مبتلا

[1] human leukocyte antigen-DQ

به دیابت تیپ1.

۲. تعیین پلی مورفیسم ژن TAP-2 در کدون ٥٦٥ (GCT→ACT, Ala→Thr) در افراد سالم.

۳. تعیین پلی مورفیسم ژن TAP-2 در کدون ٦٦٥ (ACA→GCA, Thr→Ala) در بیماران مبتلا به دیابت تیپ1.

٤. تعیین پلی مورفیسم ژن TAP-2 در کدون ٦٦٥ (ACA→GCA, Thr→Ala) در افراد سالم.

٥. مقایسه پلی مورفیسم ژن TAP-2 در کدون های ٥٦٥ و ٦٦٥ در دو گروه بیمار و افراد سالم.

٦. تعیین ژنوتیپ و فنوتیپ TAP-2 در کدون های ٥٦٥ و ٦٦٥ در گروه بیمار و افراد سالم.

۷. مقایسه ژنوتیپ و فنوتیپ TAP-2 در کدون های ٥٦٥ و ٦٦٥ در دو گروه بیمار و افراد سالم.

۹. تعیین فراوانی آللی در افراد بیمار و سالم

۱۰. مقایسه فراوانی آللی در دو گروه بیمار و سالم

۸. مقایسه هاپلوتایپهای TAP-2 در دو گروه بیمار وسالم

۱-۱-۳) فرضیات و سوالات تحقیق

۱- الگوی پلی مورفیسم ژن TAP-2 در کدون های ٥٦٥ و ٦٦٥ در جامعه نرمال ساکن خراسان چگونه است؟

۲- الگوی پلی مورفیسم ژن TAP-2 در گروه بیماران مبتلا به دیابت تیپ1 ساکن خراسان چگونه است؟

۳-آیا پلی مورفیسم ژن TAP-2 در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت تیپ1 و افراد نرمال با یکدیگر تفاوتی دارد؟

٤- آیا فراوانی ژنوتیپ ، فنوتیپ ، هاپلوتیپ و توزیع آللی ژن TAP-2 در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت تیپ1 و افراد نرمال با یکدیگر تفاوتی دارد؟

۱-۱-٤) روش اجرای پایان نامه

جامعه مورد مطالعه ۱۸۷ نفر شامل ۱۰۰ نفرسالم(هیچ گونه علائم کلینیکی دال بر هر گونه بیماری نداشته باشند) و۸۷ نفر از بیماران دیابت تیپ1 و غیر خویشاوند انتخاب شده است. افراد مورد مطالعه

در هرگروه پس از توجیه طرح تحقیقاتی و اخذ رضایت آگاهانه ، ابتدا توسط پزشک ثابت معاینه و مصاحبه شده و اطلاعات بالینی وآزمایشگاهی آنان در پرسشنامه ثبت شده است.۱۰ سی سی نمونه خون وریدی از هر فرد مبتلا به دیابت تیپ1 به روش استریل در آزمایشگاه بیمارستان قائم مشهد و ۱۰ سی سی نمونه خون وریدی افراد سالم در مرکز انتقال خون گرفته شد و در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA[1] جمع آوری شد ند. این نمونه ها تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه ایمونوژنتیک پژوهشکده بو علی منتقل شدند و DNA با استفاده از روش استاندارد salting out و طبق پروتکل شرکت سازنده کیت (شرکت بیوژن) از خون تام استخراج شد.

پلی مورفیسم ژن TAP-2 در افراد جامعه مورد مطالعه به روشARMS-PCR[2] تعیین گردید. در نهایت محصول PCR تولید شده در ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شده و نتایج براساس وجود یا عدم وجود باندهای مورد نظر ثبت گردید. داده ها به کمک نرم افزار SPSS (ورژن ۱۲) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

۱-۱-۵) واژه های کلیدی

۱- TAP- مولکولی است که در انتقال آنتی ژن های پردازش شده به غشا رتیکولوم اندوپلاسمیک و اتصال آن به شیار HLA کلاس I نقش ایفا می کند.

۲- T1DM [3] - دیابت تیپ 1 یک بیماری خود ایمنی با واسطه سلولهای T است که با تخریب انتخابی سلولهای بتا در پانکراس مشخص می شود.

۳- PCR [4] - یا واکنش زنجیره ای پلیمراز که یک تکنیک مولکولی جهت تکثیر یک قطعه ژنی است.

٤- ARMS- تکنیک مولکولی جهت تکثیر یک قطعه ژنی برای تشخیص جهش نقطه ای با کمک حداقل سه آغازگر مشخص می باشد.

۵ - SNP[5] - تغییرات تک نوکلئوتیدی در DNA که می توانند در بروز برخی بیماریها یا پاسخ بدن به مواد غذایی یا دارویی نقش داشته باشند.

---

[1] Etelen Diamin Tetra Acetic acid
2 Amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction
3 Type I diabetes mellitus
4 Polymerase Chain Reaction
[5] Single Nucleotide Polymorphism

۱-۱-٦) نوع تحقیق

این تحقیق، یک تحقیق کابردی- بنیادی می باشد.

۱-۱-۷) شیوه گردآوری اطلاعات

شیوه گردآوری اطلاعات آزمایشگاهی می باشد.

۱-۱-۸) متغیرها

جدول۱-۱) متغییر های تحقیق

نام متغیر	نقش	نوع	مقیاس	تعریف کاربردی	واحد اندازه گیری
سن	مستقل	کمی	نسبتی	سالهای سپری شده از زمان تولد	سال
جنس	مستقل	کیفی	اسمی	فنوتیپ و مشخصات ظاهری فرد	زن یا مرد
مدت ابتلا به بیماری	وابسته	کیفی	اسمی	سالهای سپری شده از زمان تشخیص بیماری	سال
سابقه فامیلی دیابت	وابسته	کیفی	اسمی	وجود بیماری شناخته شده در فامیل درجه یک فرد مورد مطالعه	دارد یا ندارد
جایگاه ٥٦٥ ژن TAP-2	مستقل	کیفی	اسمی	سه نوکلئوتید موجود در هر کدون در ژن TAP-2	Ala/ Thr
جایگاه ٦٦٥ ژن TAP-2	مستقل	کیفی	اسمی	سه نوکلئوتید موجود در هر کدون در ژن TAP-2	Thr/ Ala

۱-۱-۹) نحوه تجزیه و تحلیل داده ها و روش آماری

داده های حاصل از مشاهدات بالینی وآزمایشگاهی به رایانه وارد وبه کمک نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۲) توسط روشهای آماری توصیفی شامل شاخص های مرکزی و پراکندگی و توزیع فراوانی و روش های آماری تحلیلی شامل آزمونهای غیر پارامتریک fisher's exact test و-chi square test ، نتایج در قالب جداول و نمودارهای مناسب ارایه شد.

۱-۱-۱۰) بررسی متون

در این زمینه در ایران کاری انجام نشده است . اما در خارج از ایران در یک مطالعه که توسط Jackson و Capra در سال ۱۹۹۵ در مجله Hum Immunol چاپ شد و بر روی ۲۰۸ فرد کنترل و ۲٤۱ فرد مبتلا به دیابت نوع 1 قفقازی صورت گرفت. نتایج حاکی از آن است که ارتباط نسبی بین TAP-2 و دیابت نوع1 وجود دارد. آلل TAP-2*F در افراد دیابتی بطور معناداری افزایش نشان می دهد[۲].

در گزارشی که در سال ۱۹۹۷ توسط Rauh و همکارانش در مجله European Journal Of Immune Genetics منتشر شد. این مطالعه بر روی ۱۲۰ بیمار مبتلا به دیابت تیپ1 و ۲۱۸ فرد کنترل سالم آلمانی که بطور تصادفی انتخاب شده بوند، انجام شد. نتایج نشان داد که TAP-2*0101 (۹٦٪ در بیماران در مقابل ٦۹٪ در افراد کنترل سالم ،p-value <0.0001) ارتباط مثبتی با دیابت تیپ1 نشان می دهد و همچنین ارتباط بین توزیع آللی TAP و دیابت تیپ1 در بیماران آلمانی با آللهای HLA مختلف مشاهده می شود[۳].

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Hui و همکارانش در مجله Diabetes چاپ شد، این مطالعه در کشور کانادا بر روی ۸۸۹ بیمار مبتلا به دیابت تیپ1 با سن کمتر از ۱۸ سال به همراه والدین ایشان، یعنی در مجموع ۲٦٦۷ نفرانجام شد. نتایج بدست آمده از تکنیک SNP نشان داد ارتباط معنادار دیابت تیپ1 با تغییرات ژنتیکی در ژن TAP-2 مشاهده می شود[٤].

در مطالعه دیگر که در سال ۲۰۰۳ توسط Hoarau و همکارانش در مجله European Journal Of Immune Genetics منتشر شد، این تحقیق در فرانسه بر روی ٤۳۸ مورد انتخاب شده از جمعیتهای مختلف شامل ۱٦٤ فرد مبتلا به دیابت تیپ1 و ۲۷٤ فرد کنترل انجام شد، همچنین سن بیماران در هنگام تشخیص کمتر از ۳۰ سال بود. نتایج بدست آمده از تکنیک ARMS-PCR نشان دادند که پلی مورفیسم ژن TAP-2 با اندکی تفاوت در جمعیتهای مختلف در بروز بیماری در تمامی گروههای مورد بررسی، نقش دارد[۵].

در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۲ در مجله Cracad sci III توسط Boitard.C و همکارانش چاپ شد. این تحقیق بر روی ۱۱٦ فرد مبتلا به دیابت تیپ1و ۹۸ فرد کنترل سالم در پاریس صورت گرفت. این مطالعه نشان می دهد بین توزیع آلل TAP-2 و دیابت تیپ1 ارتباط برقرار می باشد[٦].

۱-۲) کلیات

۱-۲-۱) دیابت میلتوس (DM1)

۱-۲-۱-۱) تعریف

دیابت میلتوس (DM) شامل گروهی ازاختلالات متابولیک شایع است که وجه مشترک آنها در فنوتیپ هیپرگلیسمی می باشد.انسولین هورمونی است که توسط لوزالمعده ترشح می شود و با تاثیر بر تولید و ذخیره سازی گلوکز، سطح این ماده در خون را کنترل می کند[۷].

در بیماری دیابت ممکن است پاسخ بدن به انسولین کاهش یابد و یا تولید انسولین توسط لوزالمعده از حد لازم پایین تر بیاید. این حالات موجب پیدایش اختلالاتی در متابولیسم کربوهیدراتها، چربی و پروتئین ها می شود. چند نوع مشخص و مجزای دیابت شیرین وجود دارند که در اثر واکنش های پیچیده ای که بین عوامل ژنتیکی، فاکتورهای محیطی، و شیوه زندگی رخ می دهد بوجود می آیند. اختلال تنظیم متابولیکی ناشی از دیابت شیرین سبب بروز تغییرات پاتوفیزیولوژیک ثانویه ای در اندامهای متعدد بدن می شود. در ایالات متحده، دیابت شیرین علت بیماری مرحله انتهایی کلیوی(ESRD[۲]) ،آمپرتاسیونهای غیرتروماتیک اندام تحتانی، و کوری بالغین می باشد . با افزایش شیوع دیابت شیرین در سراسر جهان، انتظار می رود که این بیماری همچنان یکی از علل اصلی بیماریزایی و مرگ و میر باقی بماند[۷].

۱-۲-۱-۲)طبقه بندی

طبقه بندی دیابت شیرین بر اساس روندهای پاتولوژیکی است که باعث هیپرگلیسمی می شوند، و نه معیار های قدیمی تری نظیر سن شروع و یا نوع درمان. دو گروه عمده دیابت شیرین به عنوان نوع 1و2 نامگذاری شده اند.در نوع1 سابقه ژنتیکی بعلاوه عوامل محیطی (ویروسی) دخالت دارد ژن بیماری روی بازوی کوتاه کرموزوم شماره ٦ در ناحیه HLA-D (۹۰ تا ۹۵درصد) به شکل یک بیماری خودایمنی سبب آسیب جزایر لانگرهانس می شود. دیابت شیرین نوع 1A در نتیجه تخریب خود ایمنی سلولهای بتا رخ می دهد که منجر به کمبود انسولین می گردد. افراد مبتلا به دیابت شیرین نوع 1B فاقد نشانگرهای ایمونولوژیکی هستند که دال بر روند تخریب خودایمنی سلولهای بتا باشند. با این حال این بیماران از طریق مکانیسمهای ناشناخته ای دچار کمبود انسولین می شوند و مستعد

---

[1] Diabetes mellitus
[2] End stage renal disease

ابتلا به کتوز هستند. تعداد نسبتا کمی از بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع1 در گروه ایدیوپاتیک 1B قرار می گیرند؛ بسیاری از این افراد از نژاد آفریقایی- آمریکایی یا آسیایی هستند[۷و۸].

دیابت شیرین نوع 2 شامل گروه ناهمگونی از اختلالات است که معمولا با درجات متفاوتی از مقاومت به انسولین، اختلال ترشح انسولین ، و افزایش تولید گلوکز مشخص می شوند. بروز نقائص ژنتیکی و متابولیکی مجزا در فعالیت و یا ترشح انسولین ، سبب ایجاد فنوتیپ مشترک هیپرگلیسمی در دیابت شیرین نوع 2 می شود. دیابت نوع 2 بطور کامل وابسته به ژن می باشد و در آن خودایمنی وجود ندارد ولی اختلال تراوش انسولین در سلولهای بتا و مقاومت انسولین دخیل می باشد. مقاومت به انسولین مربوط به نقصان فعالیت تیروزین کیناز می باشد که اتصال انسولین را با رسپتورش را موجب می شود. اتیولوژی شامل چاقی، توارث و یا عوامل محیطی می باشد. عوارض حاد آن سندرم هیپراوسمولار بدون کتوز است[۷و۸].

دو ویژگی طبقه بندی کنونی دیابت شیرین با طبقه بندیهای قبلی متفاوت است. اول اینکه اصطلاحات دیابت شیرین وابسته به انسولین (IDDM[1]) و دیابت شیرین غیر وابسته به انسولین (NIDDM[2]) دیگر مورد استفاده قرار نمی گیرند. از آنجا که تعداد زیادی از بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع2 در نهایت برای کنترل هیپرگلیسمی خود به انسولین نیاز پیدا می کنند. تفاوت دیگر این است که در طبقه بندی جدید، سن بیمار به عنوان یک معیار بکار نمی رود. با اینکه دیابت شیرین نوع1 اکثرا قبل از ۳۰ سالگی بروز می کند، ولی روند تخریب خود ایمنی سلولهای بتا ممکن است در هر سنی رخ دهد. تخمین زده می شود که بین ۵تا ۱۰٪ افرادی که پس از ۳۰ سالگی دچار دیابت شیرین می شوند، مبتلا به نوع1A هستند. به همین ترتیب، با اینکه دیابت شیرین نوع2 نوعا با افزایش سن بوجود می آید، ولی در اطفال و به ویژه نوجوانان چاق نیز رخ می دهد[۷و۸].

۱-۲-۲)دیابت شیرین نوع1 (T1DM)

دیابت شیرین (DM) نوع1A یک بیماری متابولیک چند سیستمی است که در نتیجه اثرات هم افزای عوامل ژنتیکی ، محیطی (ویروس) و ایمونولوژیکی بوجود می آید و در نهایت سبب تخریب سلولهای بتای جزایر لانگرهانس پانکراس می شوند. پاسخ های اتوآنتی بادی یا سلول T ضد آنتی ژنهای خودی مختص بافت خاصی منجر به بیماریهای ویژه عضو مانند دیابت میلتوس تیپ1 می

[1] Insulin-dependent diabetes mellitus
[2] Non-Insulin-dependent diabetes mellitus

شود. در این بیماری عوامل تخریب کننده سلولهای بتا، سلولهای T سیتوتوکسیک ، سایتوکاینها و اتوآنتی بادی ها هستند[۹].

در افرادی که استعداد ژنتیکی برای ابتلا دیابت نوع1A دارند، حجم سلولهای بتا در بدو تولد طبیعی است، ولی به دلیل تخریب خودایمنی که ماهها تا سالها رخ می دهد، این سلولها بتدریج از بین می روند. تصور می شود که این روند خود ایمنی به وسیله یک عامل تحریکی عفونی یا محیطی شروع شده و به واسطه یک مولکول اختصاصی سلول بتا تداوم پیدا می کند. در اکثر افراد ، نشانگرهای ایمونولوژیک پس از تحریک شروع کننده و قبل از اینکه دیابت از نظر بالینی آشکار شود ظاهر می گردند. سپس حجم سلولهای بتا بتدریج کاهش یافته و ترشح انسولین به شکل پیش رونده ای مختل می شود، ولی تحمل طبیعی گلوکز حفظ می شود. سرعت کاهش حجم سلولهای بتا در میان افراد مختلف تفاوتهای زیادی نشان می دهد، به شکلی که بعضی از بیماران به سرعت به طرف دیابت بالینی پیش می روند و سایرین بسیار آهسته به این سمت سیر می کنند . تا زمانی که قسمت اعظم سلولهای بتا تخریب نشده باشند(تقریبا۸۰٪) ویژگیهای دیابت آشکار نمی شوند. در این مرحله هنوز بقایای سلولهای بتای دارای عملکرد وجود دارند ولی تعداد آنها برای حفظ تحمل گلوکز کافی نیست. وقایعی که سبب تبدیل حالت عدم تحمل گلوکز به دیابت آشکار می شوند غالبا با افزایش نیاز به انسولین همراه هستند، چنانکه این حالت در زمان بلوغ یا هنگام بروز عفونت ها رخ می دهد. به دنبال اولین تظاهر بالینی دیابت شیرین نوع1A ، ممکن است یک دوره ماه عسل وجود داشته باشد که طی آن می توان با حداقل دوز انسولین ، و یا بندرت بدون نیاز به انسولین ، قند خون را کنترل نمود. با این حال این دوره زودگذر تولید انسولین داخلی به وسیله بقایای سلولهای بتا به سرعت سپری می شود، چون روند خودایمنی بقیه سلولهای بتا را نیز تخریب کرده و فرد کاملا دچار کمبود انسولین می شود. افراد مبتلا به دیابت تیپ1 توسط تولید آنتی بادیهای آنتی انسولین مشخص می شوند. انسولین یکی از اتوآنتی ژنهای مهم در این بیماری است . فقدان انسولین به نوبه خود مسئول فنوتایپ دیابت میلتوس نوع1 می باشد. کمبود انسولین سبب ازدیاد cAMP [1]درون سلولی و افزایش گلیکوژنولیز ، لیپولیز و پروتئولیز می شود. از تجزیه پروتئین ها، اسیدهای آمینه آزاد می شود که سبب تولید گلوکز (آلانین) و یا مواد کتونی (والین، لوسین، ایزولوسین) می شوند. تجزیه گلیکوژن و گلوکونئوژنز از اسید های آمینه مثل آلانین سبب افزایش گلوکز می شود. افزایش لیپولیز سبب آزاد شدن تری گلیسریدها و تجزیه تری گلیسریدها سبب افزایش گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد

[1] Cyclic 3′,5′Adenosine monophosphate

(FFA[1]) می شود. اسیدهای چرب آزاد تولید استواستات می کند که ممکن است خود تبدیل به بتا هیدروکسی بوتیرات و استون شود و این سه ماده را اجسام کتونی می نامند. لذا اثرات حاد کمبود انسولین، هیپرگلیسمی و کتو اسیدوز است و درمان جایگزین هورمونی برای افراد مبتلا به دیابت تیپ1 استفاده می شود. دیابت تیپ1 در ۹۰٪ حالات بین ۱۰ تا ١٤ سالگی شروع می شود[۹].

۱-۲-۲-۱)اپیدمیولوژی

میزان وقوع جهانی دیابت شیرین طی دو دهه گذشته به نحو چشمگیری افزایش یافته است.

دیابت نوع1 در حدود ۲۰ درصد موارد موارد بیماری دیابت را تشکیل می دهد. تنوع جغرافیایی قابل ملاحظه ای در میزان بروز دیابت میلتوس نوع1 دیده می شود. برای مثال ، در کشورهای اسکاندیناوی بیشترین میزان دیابت شیرین نوع1 دیده می شود(در فلاند، میزان بروز آن ۳۵ مورد از هر ۱۰۰۰۰۰نفر در هر سال است). میزان بروز دیابت شیرین نوع1 در حاشیه اقیانوس آرام بسیار کمتر از این حد است (در ژاپن و چین، یک تا سه مورد از هر ۱۰۰۰۰۰نفر در هر سال)؛ در اروپای شمالی و ایالات متحده میزان بروز آن در حد متوسطی قرار دارد(۸ تا۱۷ مورد از هر ۱۰۰۰۰۰نفر در سال). اعتقاد براین است که دلیل اصلی افزایش خطر ابتلا به دیابت شیرین نوع1، افزایش شیوع آللهای پرخطر HLA در میان گروههای قومی مختلف در نواحی جغرافیایی متفاوت می باشد.دیابت نوع1 حدود ۰/۲ درصد از جمعیت ایالات متحده را در طیف سنی ۱۱تا ۱۲ سال تحت تاثیر قرار می دهد و شیوع آن در حال افزایش است[۹].

۱-۲-۲-۲)اتیولوژی

دبابت نوع1 با تخریب سلولهای بتا در لوزالمعده مشخص می شود. عوامل ژنتیکی (وارثت ژنهای خاصی در آنتی ژنی لکوسیت انسانی HLA)، عوامل ایمنی شناختی (پاسخ غیر طبیعی با آنتی بادی تولید شده علیه بافت های بدن) و عوامل محیطی (ویروس ها وسموم خاص که سبب شروع فرآیندهای خودایمنی می شوند) از جمله عوامل موثر در شروع دیابت نوع1 شناخته شده اند. برخی مطالعات پیشنهاد کرده اند که عفونتهای ویروسی (مثل کوکساکی ویروس B4)ممکن است قبل از شروع T1D وجود داشته باشند، شاید با شروع آسیب سلولی ، از جمله التهاب و بروز کمک محرک ها و آغاز یک پاسخ اتوایمنی همراه باشد. با وجود این اطلاعات اپیدمیولوژیک نشان می دهند که

[1] Free fatty acid