

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن های *CXCR4* و *CXCL12* با استعداد ابتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیرشونده در بیماران دیابتی

صبا غریبی^{۱،۲}، شیوا آقایی^۳، انسیه شهوازیان^۴، محمدباقر محمودی^۴، محمدحسین سهامی فرد^۱، پریسا کلاهدوز^۱، احسان فراشاهی یزد^{۳*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: بیماران مبتلا به دیابت مستعد پیشروی عوارض مرتبط با شبکه هستند. تاکنون چندین ژن در ارتباط با پیشروی رتینوپاتی گزارش شده است که گروهی از این ژن ها، ژن های درگیر در رگزایی هستند. ژن های *CXCR4* و *CXCL12* از جمله مهم ترین ژن ها در این مسیر هستند که کمتر مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند. هدف این مطالعه تعیین ارتباط میان پلی مورفیسم ژن های *CXCL12* (rs1801157) و *CXCR4* (rs2228014) و ریسک ابتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیرشونده در جمعیت یزد می باشد.

روش بررسی: در مطالعه مورد-شاهدی حاضر پلی مورفیسم های rs1801157 و rs2228014 در میان ۱۰۳ بیمار مبتلا به دیابت در قالب دو گروه مورد و شاهد مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، گروه شاهد شامل ۴۹ بیمار مبتلا به دیابت بوده که عارضه رتینوپاتی را نشان نداده اند و گروه مورد از ۵۴ بیمار دیابتی دارای عارضه رتینوپاتی تکثیر شونده تشکیل شده است. تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم rs2228014 با استفاده از روش ARMS-PCR و واریانت rs1801157 به روش RFLP-PCR صورت گرفت. به منظور تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS version 16 و آزمون کای-دو استفاده گردید.

نتایج: مدل های ژنتیکی مربوط به پلی مورفیسم های rs1801157 و rs2228014 در بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیرشونده در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معناداری از لحاظ آماری نشان نداد ($P > 0.05$).

نتیجه گیری: این مطالعه ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم های rs1801157 و rs2228014 و ریسک ابتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیرشونده نشان نداد. ارزیابی این پلی مورفیسم ها در جمعیت های مختلف و گسترده تر به منظور کسب نتایج دقیق تر پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: رتینوپاتی دیابتی تکثیر شونده، پلی مورفیسم، *CXCR4*، *CXCL12*

ارجاع: غریبی صبا، آقایی شیوا، شهوازیان انسیه، محمودی محمد باقر، سهامی فرد محمد حسین، کلاهدوز پریسا، فراشاهی یزد احسان. **بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن های *CXCR4* و *CXCL12* با استعداد ابتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیرشونده در بیماران دیابتی.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰ (۷): ۴۱-۵۰۳۲.

۱- گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۲- مرکز تحقیقات دیابت یزد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۳- مرکز تحقیقات بیولوژی سلول های بنیادی، پژوهشکده علوم تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۴- بخش تحقیق و توسعه، شرکت فناوری روژه، یزد، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۲۵۸۳۰۵۶، پست الکترونیکی: ehsanfarashahi@gmail.com، صندوق پستی: ۸۹۱۶۸۷۷۳۹۱

آسیب رگی باعث تولید (HIF-1) hypoxia Induced Factor شده که آن نیز به نوبه خود باعث تولید SDF-1، vascular endothelial growth factor (VEGF) و (Stromal Derived Factor 1) CXC motif (CXCR4) chemokine receptor 4 می‌شود (۹-۱۲). VEGF از مولکول‌های اصلی رگ‌زایی بوده و باعث افزایش تولید CXCR4 شده و پس از اتصال آن با لیگاند خود یعنی SDF-1 باعث افزایش تولید VEGF می‌شوند (۱۳، ۱۴). VEGF با همکاری اندواستاتین و PF4 عمل کرده و باعث رگ‌زایی و نشت دیواره رگ‌ها می‌شود. دو فاکتور اصلی رگ‌زایی VEGF و SDF1 (CXCL12) در فرایند رگ‌زایی رتینوپاتی نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند. ژن *CXCL12* بر روی کروموزوم ۱۰ قرار داشته و دارای ۴ ایزوفرم با نام‌های *SDF1 α* ، *SDF1 β* ، *SDF1 γ* و *SDF1- δ* است. گیرنده *CXCL12*، *CXCR4* می‌باشد که ژن آن بر روی کروموزوم ۲ قرار دارد و پروتئین عرض‌غشایی است و در سطح سلول قرار می‌گیرد (۱۷-۱۵). در این مطالعه به توجه به نقش کلیدی ژن‌های *CXCL12* و *CXCR4* در پاتوژنز بیماری رتینوپاتی دیابتی، ارتباط پلی‌مورفیسم‌های موجود در ژن‌های *G801A (rs1801157)* *CXCL12* و *C138T (rs2228014)* با بیماری رتینوپاتی دیابتی در جمعیت ایرانی ارزیابی می‌شود.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA

در مطالعه مورد-شاهدی حاضر پلی‌مورفیسم‌های *rs1801157* و *rs2228014* در میان ۱۰۳ بیمار مبتلا به دیابت مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات دیابت یزد مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، گروه شاهد شامل ۴۹ بیمار مبتلا به دیابت که با گذشت بیش از ۲۰ سال از ابتلا به این بیماری هنوز عارضه رتینوپاتی را نشان نداده‌اند و گروه مورد ۵۴ بیمار دیابتی هستند که با توجه به مدت کمتر از ۱۵ سال ابتلا به این بیماری عارضه رتینوپاتی تکثیر شونده را نشان داده‌اند. تشخیص عارضه رتینوپاتی و دسترسی به سوابق بیماران با توجه به نظر متخصص چشم پزشکی و آنژیوگرافی فلوئورسئین از

دیابت شیرین یک بیماری متابولیک مزمن بوده که با سطح بالای گلوکز در خون شناخته می‌شود و به علت ترشح ناکافی انسولین یا عدم حساسیت به آن ایجاد می‌شود. تقریباً ۴٪ جمعیت جهان به این بیماری مبتلا بوده و پیش‌بینی می‌شود این میزان در سال ۲۰۲۵ به ۵/۴٪ برسد. بیماران دیابتی مشکلات عروقی متنوعی نظیر آترو اسکلروزیس، نفروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی را تجربه کرده و به خاطر فراوانی بالای دیابت این اختلالات جزو مشکلات مهم سلامت عموم در نظر گرفته می‌شوند (۱، ۲). بیشتر بیماران دیابتی به ویژه افرادی که کنترل ضعیف قند خون دارند دچار رتینوپاتی دیابتی شده و مهم‌ترین عامل کوری بین افراد ۲۰ تا ۷۴ سال می‌باشد. این عارضه که با افزایش نفوذپذیری رگ، افزایش ایسکمی، رگ‌زایی و التهاب نسبی همراه است و تقریباً تمام افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ و بیش از ۶۰٪ افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ را در دو دهه ابتدای ابتلا به بیماری درگیر می‌کند (۳-۶). نقش فاکتورهای ژنتیکی در پیامدهای ثانویه دیابت شناخته شده و وراثت‌پذیری رتینوپاتی دیابتی بین ۲۵ تا ۵۰ درصد تخمین زده شده است. رتینوپاتی دیابتی می‌تواند به دو گروه تکثیری و غیرتکثیری تقسیم شود (۶). ابتدایی‌ترین علائم رتینوپاتی غیر تکثیری میکروآنوریسم (اتساع عروق) و خونریزی شبکیه است. پس از آن عدم خون‌رسانی پیش‌رونده مویرگ‌ها با ایجاد لکه‌های سفید داخل شبکیه و ناهنجاری‌های ریز عروقی داخل شبکیه همراه شده و بدین ترتیب رتینوپاتی دیابتی تکثیری با وقوع ایسکمی بیشتر در شبکیه رخ می‌دهد. این عارضه با رشد رگ‌های جدید بر روی سطح شبکیه یا صفحه بینایی شناسایی می‌شود. این رگ‌های غیر طبیعی ممکن است خونریزی کرده و باعث هموراژ زجاجیه، در پی آن فیبروز و در نهایت جداسازی انقباضی شبکیه شوند (۷). رشد پاتولوژیک رگ‌های خونی جدید در بیماری‌های نئوواسکولار چشمی مانند رتینوپاتی تکثیری یک عارضه مشترک است که در نهایت باعث از بین رفتن دید می‌شود (۸). اساس بیماری رتینوپاتی دیابتی تکثیری بر پایه آسیب به رگ و رگ‌زایی جدید می‌باشد و هایپوکسی کاذب و

صورت گرفت (Cinnagen, Tehran, Iran). تکثیر در ۳۲ سیکل و سیکل سه مرحله‌ای شامل دمای ۹۴ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و طول‌سازی نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس محصول‌های PCR توسط آنزیم HpaII تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند. واکنش هضم آنزیمی شامل محصول PCR، یک واحد آنزیم، بافر 10xB و آب مقطر استریل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت حدود سه ساعت انجام گرفت. قطعات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز یک درصد، تفکیک و مورد بررسی قرار گرفت. برای افراد دارای ژنوتیپ TT یک قطعه ۵۹۴ جفت‌بازی و افراد دارای ژنوتیپ CC دو قطعه ۳۳۳ و ۲۶۱ جفت‌بازی و افراد با ژنوتیپ TC سه قطعه به طول ۵۹۴، ۳۳۳ و ۲۶۱ جفت‌باز بر روی ژل مشاهده شد. برای تایید یافته‌های تعیین ژنوتیپ، ۱۰ درصد از نمونه‌ها تعیین توالی‌یابی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS version 16 استفاده گردید. برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ و مدل‌های ژنتیکی (آلی، هوموزیگوت، هتروزیگوت، غالب و مغلوب) این دو پلی مورفیسم از آزمون خی دو و فیشر استفاده و شانس ابتلا و فاصله اطمینان محاسبه گردید و هم‌چنین $P < 0.05$ به عنوان سطح معناداری داده‌ها در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تکمیل شده است (کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC1393.111566).

نتایج

پلی مورفیسم rs2228014 از ژن CXCR4

از میان ۱۰۳ بیمار وارد شده به مطالعه، ۵۵ بیمار مرد و ۴۸ بیمار زن بوده که میانگین سنی آنها به ترتیب $61 \pm 1/1$ و $58/8 \pm 1/4$ می باشد.

شبکیه چشم صورت گرفته است. پس از اعلام توضیحات لازم به بیماران، آگاهی دادن در رابطه با هدف مطالعه و کسب رضایتنامه، میزان ۵ سی‌سی خون وریدی طبق دستورالعمل کمیته اخلاق پزشکی از آن‌ها دریافت گردید. مراحل بعدی مطالعه پس از همسان‌سازی هر دو گروه بر اساس سن، جنسیت و مدت ابتلا به دیابت انجام گرفت. افراد دیابتی فاقد PDR به مدت بیش از ۲۰ سال به دیابت مبتلا بوده و افراد دیابتی مبتلا به رتینوپاتی کمتر از ۱۵ سال از ابتلا به دیابت آنها سپری شده بود. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی و بر اساس دستورالعمل تولیدکننده استخراج شد (bioneer, Daejeon, Korea). خلوص و کیفیت نمونه‌های DNA نیز با استفاده از نانودراپ اسپکتروفوتومتر ۲۰۰۰ و ژل الکتروفورز بررسی گردید (Thermo Scientific MA USA).

تعیین ژنوتایپ به روش ARMS-PCR

در این مطالعه برای بررسی پلی مورفیسم rs2228014 از تکنیک ARMS-PCR استفاده و پرایمرهای مورد نیاز با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ طراحی گردید (۱۸). برای انجام این تکنیک دو آنالیز PCR با استفاده از یک DNA الگو در دو ویال جداگانه که یکی از آن‌ها حاوی پرایمر طبیعی و دیگری حاوی پرایمر جهش یافته بود، انجام گرفت (جدول ۱). در هر واکنش پرایمرهای مشترک به همراه یکی از دو پرایمر اختصاصی آلل مورد استفاده قرار گرفت و محصول حاصل از تکنیک-PCR ARMS بر روی ژل آگارز مشاهده شد. تکثیر تحت شرایط دناتوراسیون ابتدایی به مدت پنج دقیقه و سیکل سه مرحله‌ای شامل دناتوراسیون به مدت ۱۵ ثانیه، آنیلینگ ۲۰ ثانیه و طول‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در ۳۵ تکرار انجام شد و در پایان طول‌سازی نهایی به مدت پنج دقیقه صورت گرفت.

تعیین ژنوتایپ به روش RFLP-PCR

در این مطالعه جهت بررسی پلی مورفیسم rs1801157 از یک جفت پرایمر رفت و پرایمر برگشت استفاده گردید (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل DNA با غلظت 100 ng نانوگرم بر میکرولیتر، پرایمرها با غلظت یک پیکومول بر میکرو لیتر و مسترمیکس حاوی Taq polymerase

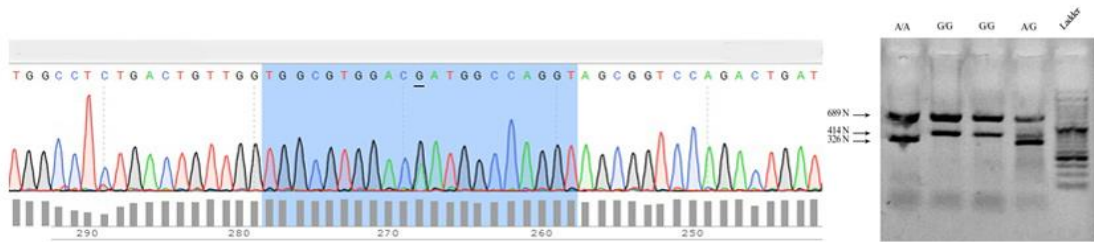
پلی مورفیسیم rs1801157 از ژن *CXCL12*

پلی مورفیسیم rs1801157 واقع در ژن *CXCL12* دارای دو واریانت C و T بوده که آلل حاوی واریانت T به میزان کمتری در جمعیت مشاهده شده است. محصولات هضم آنزیمی محصول PCR با طول ۵۴۵ نوکلئوتیدی در صورت حضور آلل C در محل پلی مورفیسیم ایجاد برش توسط آنزیم *HpaII* و به وجود آمدن دو قطعه ۳۳۱ و ۲۱۴ نوکلئوتیدی خواهد بود و در صورت حضور آلل T با توجه به عدم امکان هضم توسط آنزیم، محصول ۵۴۵ نوکلئوتیدی دست نخورده باقی می ماند (Error! Reference source not found). تفاوت توزیع ژنوتیپی میان دو گروه مورد و شاهد بررسی شد (Error! Reference source not found). که این تفاوتها از لحاظ آماری معنادار نبود ($P=0/14$). همچنین آنالیز مدل های ژنتیکی برای این پلی مورفیسیم صورت گرفت که تنها مدل آللی میان پلی مورفیسیم rs1801157 و بیماری PDR تفاوت معناداری نشان داد ($P=0/04$). (Error! Reference source not found). همچنین در گروه کنترل تعادل هاردی-واینبرگ مورد بررسی گرفت که نتایج عدم تعادل را در این گروه نشان داد.

پلی مورفیسیم rs2228014 واقع در ژن *CXCR4* دارای دو واریانت A و G بوده که آلل حاوی واریانت A به میزان کمتری در جمعیت های بررسی شده مشاهده شده است. محصولات PCR با روش ژنوتایپینگ Tetra-primer ARMS شامل قطعه ۴۱۴ نوکلئوتیدی در صورت حضور آلل G و قطعه ۳۲۶ نوکلئوتیدی در صورت حضور آلل A و محصول ۶۸۹ نوکلئوتیدی کنترل داخلی بود (شکل). فراوانی ژنوتیپی این پلی مورفیسیم در دو جمعیت مورد و شاهد تفاوت هایی را نشان داد که این تفاوتها از لحاظ آماری معنادار نبود ($P=0/47$) (جدول ۲). از سوی دیگر ارتباط پلی مورفیسیم rs2228014 و بیماری PDR در مدل های ژنتیکی مختلف نظیر آللی ($P=0/06$)، هوموزیگوت ($P=0/69$)، هتروزیگوت ($P=0/99$) غالب ($P=0/82$) و مغلوب ($P=0/63$) مورد ارزیابی قرار گرفت که مقادیر یافت شده از نظر آماری معنادار نبود (Error! Reference source not found). همچنین ارزیابی صورت گرفته در گروه کنترل عدم تعادل هاردی-واینبرگ را در این گروه نشان داد.

جدول ۱: پرایمرهای طراحی شده به منظور بررسی پلی مورفیسیم های rs1801157 و rs2228014

ژن	پلی مورفیسیم	توالی	روش	محصول
<i>CXCR4</i>	rs2228014	Outer F. 5'-AAATCTTCCTGCCACCATCTACTCCATCA-3'	ARMS PCR	OF+OR=۶۸۹ IF+OR=۴۱۴ OF+IR=۳۲۶
		Outer R. 5'-CAGGAGGATGAAGGAGTCGATGCTGA-3'		
		Inner F. (G allele) 5'-TCATCAGTCTGGACCGCTACCTGGCCCTC-3'		
		Inner R. (A allele) 5'-GCCTCTGACTGTTGGTGGCGTGGCCA-3'		
<i>CXCL12</i>	rs1801157	Forward 5'-GGGTTTTGTATTCTCTGAGCTGTG-3'	PCR- RFLP	۵۴۵ ۳۳۱+۲۱۴
		Reverse 5'-AGGACGCTGGCTTTGAACA-3'		



شکل ۱: تصویر فوق تعیین توالی محصول PCR مرتبط با پلی مورفیسم rs2228014 وتوالی اطراف آن و نتایج تکثیر با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای آللهای G و A پلی مورفیسم rs2228014 ژن CXCR4 را نشان می دهد. قطعه حاصل از تکثیر با پرایمر اختصاصی آلل A قطعه ۳۲۶ نوکلئوتیدی را ایجاد می کند و آلل G قطعه ۴۱۴ نوکلئوتیدی را تکثیر می کند. تست به صورت Tetra-Primers ARMS با همراهی دو پرایمر خارجی و به صورت دو لوله ای انجام گرفته است.

جدول ۲: مقایسه فراوانی های ژنوتیپی پلی مورفیسم rs2228014 در بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیر شونده و گروه شاهد

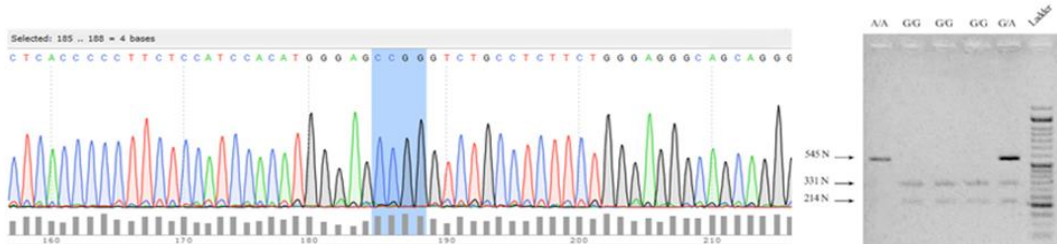
معناداری تفاوت	جمع	ژنوتیپ AA	ژنوتیپ GA	ژنوتیپ GG	گروه مورد
	۴۹	۹ (۱۸/۴٪)	۰ (۰٪)	۴۰ (۸۱/۶٪)	گروه مورد
$P=۰/۴۷$	۵۴	۸ (۱۴/۸٪)	۱ (۱/۹٪)	۴۵ (۸۳/۳٪)	گروه شاهد
	۱۰۳	۱۷ (۱۶/۵٪)	۱ (۱٪)	۸۵ (۸۲/۵٪)	جمع

• آزمون کای-دو به منظور آنالیز آماری استفاده و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معناداری در نظر گرفته شده است.

جدول ۳: مدل های ژنتیکی پلی مورفیسم rs2228014 و ارتباط آنها با بیماری رتینوپاتی دیابتی تکثیر شونده

معناداری تفاوت	فاصله اطمینان ۹۵٪ حد بالا	حد پایین	شانس ابتلا	پلی مورفیسم rs2228014
۰/۰۶	۲/۴۹	۰/۵۸	۱/۲۰	A vs. G (اللی)
۰/۶۹	۳/۵۹	۰/۴۵	۱/۲۷	AA vs. GG (هموزیگوت)
۰/۹۹	۱/۰۷	۰/۹۸	۱/۰۲	GA vs. GG (هتروزیگوت)
۰/۸۲	۳/۱۱	۰/۴۱	۱/۱۳	AA+GA vs. GG (غالب)
۰/۶۳	۳/۶۷	۰/۴۶	۱/۲۹	AA vs. GG+GA (مغلوب)

*آزمون فیشر به منظور آنالیز آماری استفاده و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معناداری در نظر گرفته شده است.



شکل ۲: تصویر فوق تعیین توالی و نتایج تکثیر با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای آللهای C و T پلی مورفیسم rs1801157 ژن CXCL12 را نشان می دهد. محصولات هضم آنزیمی محصول PCR با طول ۵۴۵ نوکلئوتیدی در صورت حضور آلل C در محل پلی مورفیسم ایجاد برش توسط آنزیم HpaII و به وجود آمدن دو قطعه ۳۳۱ و ۲۱۴ نوکلئوتیدی خواهد بود و در صورت حضور آلل T با توجه به عدم امکان هضم توسط آنزیم، محصول ۵۴۵ نوکلئوتیدی دست نخورده باقی می ماند.

جدول ۴: مقایسه فراوانی‌های ژنوتیپی پلی‌مورفیسم rs1801157 در بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیر شونده و گروه شاهد

ژنوتیپ CC	ژنوتیپ CT	ژنوتیپ TT	جمع	معناداری تفاوت
۲۷ (۰/۵۵/۱)	۱۱ (۰/۲۲/۴)	۱۱ (۰/۲۲/۴)	۴۹	P=۰/۱۴
۳۸ (۰/۶۶/۷)	۱۴ (۰/۲۴/۶)	۵ (۰/۸/۸)	۵۷	
۶۵ (۰/۶۱/۳)	۲۵ (۰/۲۳/۶)	۱۶ (۰/۱۵/۱)	۱۰۶	

* آزمون کای-دو به منظور آنالیز آماری استفاده و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معناداری در نظر گرفته شده است.

جدول ۵: مدل‌های ژنتیکی پلی‌مورفیسم rs1801157 و ارتباط آن‌ها با بیماری رتینوپاتی دیابتی تکثیر شونده

پلی مورفیسم rs1801157	شانس ابتلا	فاصله اطمینان ۹۵٪ حد پایین حد بالا	معناداری تفاوت
T vs. C (آلی)	۱/۹۰	۰/۰۴ ۳/۵۲	۰/۰۴
TT vs. CC (هموزیگوت)	۳/۱۰	۰/۰۶ ۹/۹۴	۰/۰۶
CT vs. CC (هتروزیگوت)	۱/۱۱	۰/۸۳ ۲/۸۱	۰/۸۳
TT+CT vs. CC (غالب)	۱/۶۳	۰/۲۲ ۳/۵۸	۰/۲۲
TT vs. CC+CT (مغلوب)	۳/۰۱	۰/۰۶ ۹/۳۸	۰/۰۶

*آزمون فیشر به منظور آنالیز آماری استفاده و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معناداری در نظر گرفته شده است.

بحث

القای متاستاز لنفاوی ارتباط داشته باشد. همچنین در مطالعه‌ای که بر روی بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد صورت گرفته، توزیع ژنوتیپی CT و CT+CC واریانت rs2228014 به میزان معناداری در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد (۲۱)، و همچنین در مطالعه‌ای به منظور بررسی ارتباط واریانت rs2228014 و سرطان ریه، این پلی‌مورفیسم به عنوان ریسک فاکتور احتمالی برای ابتلا به سرطان ریه گزارش گردید (۲۲). در مطالعه حاضر ارتباط معناداری میان پلی‌مورفیسم rs2228014 و استعداد ابتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیری مشاهده نشد و جستجوهای صورت گرفته در پایگاه‌های مختلف نشان داد تا کنون مطالعه‌ای مبتنی بر بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم و بیماری رتینوپاتی دیابتی صورت نگرفته و از این روی مقایسه نتایج این مطالعه با سایر مطالعات در این زمینه مقدور نمی‌باشد. لذا پیشنهاد می‌گردد این نوع مطالعه در جمعیت‌های مختلف و با حجم نمونه بالاتر صورت بگیرد تا اطلاعات وسیعتری و قابل اعتمادتری در این زمینه حاصل شود. همچنین مطالعات مختلفی در زمینه ارتباط پلی‌مورفیسم rs1801157 و CXCL12 واقع در ژن CXCL12 و استعداد ابتلا به دیابت صورت گرفته است. مطالعه مورد-شاهدی صورت گرفته بر روی

هدف اصلی مطالعه حاضر تعیین ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs1801157 و rs2228014 (واقع در ژن‌های دخیل در فرآیند ایجاد و حفظ عملکرد عروق انسانی CXCR4 و CXCL12) با استعداد ابتلا به بیماری رتینوپاتی دیابتی تکثیری بود. جهت رسیدن به این هدف مطالعه فوق بر اساس بررسی فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی پلی‌مورفیسم‌های مورد نظر در گروه‌های مورد، در مقایسه با گروه‌های کنترل صورت گرفت. مطالعات متعددی در زمینه ارتباط پلی‌مورفیسم rs2228014 واقع در ژن CXCR4 و انواع بیماری‌ها صورت گرفته است. در مطالعه کین و همکاران ارتباط این پلی‌مورفیسم و ابتلا به کارسینومای هیپاتوسلولار بررسی و ژنوتیپ‌های CC/CT به عنوان ریسک فاکتورهای افزایش دهنده ابتلا به کارسینومای هیپاتوسلولار گزارش شده‌اند (۱۹). علاوه بر این، بر اساس مطالعه‌ای که به منظور ارزیابی همراهی واریانت rs2228014 و بیماری دمانس صورت گرفته، نتایج نشان داده است که وجود آلل T می‌تواند ریسک ابتلا به دمانس را کاهش دهد (۲۰). همچنین حضور آلل T از ژن CXCR4 در بیماران مبتلا به سرطان دهان می‌تواند با گسترش مراحل سه و چهار سرطان و

نشان داده تاکنون مطالعه‌ای به منظور بررسی نقش این واریانت بر میزان استعداد ابتلا به رتینوپاتی دیابتی در جمعیت ایرانی صورت نگرفته است.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم‌های rs2228014 و rs1801157 و ریسک ابتلا به رتینوپاتی دیابتی تکثیرشونده نشان نداد. ارزیابی این پلی مورفیسم‌ها در جمعیت‌های مختلف و گسترده‌تر به منظور کسب نتایج دقیق‌تر پیشنهاد می‌گردد.

سپاس‌گزاری

مطالعه حاضر طرح تحقیقاتی مصوب در مرکز دیابت (دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد) با کد مصوب ۳۰۵۷ می‌باشد. از همکارانمان در مرکز دیابت به خاطر کمک‌های فنی و عملیاتی ایشان کمال تشکر را داریم.

حامی مالی: دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، مرکز تحقیقات دیابت یزد
تعارض در منافع: وجود ندارد.

یک جمعیت ایرانی عدم ارتباط بین این واریانت و دیابت میلیتوس را گزارش نموده (۲۳) همچنین مطالعه بر روی جمعیت هندی، نقش محافظتی آلل A این پلی مورفیسم را در برابر دیابت میلیتوس گزارش کرد (۲۴) علاوه بر این مطالعه صورت گرفته توسط ریزوی و همکاران نیز همراهی معنادار این واریانت با دیابت نوع دو را نشان داد و برای آلل A نقش محافظتی در برابر خطر ابتلا به دیابت نوع دو گزارش گردید (۲۵) در حالیکه مطالعه کیانگژو و همکاران بر روی جمعیت چینی ارتباط معناداری میان این پلی مورفیسم و دیابت نوع دو نشان نداد (۲۶). ژنوتایپ AA پلی مورفیسم rs1801157 به میزان چشمگیری در مبتلایان به کارسینومای کلیه مشاهده شده و میزان بقا در این بیماران در مقایسه با بیماران حامل ژنوتایپ GG و GA پایین‌تر گزارش شده است (۲۷). تفاوت معناداری در توزیع ژنوتایپ‌های این واریانت در میان بیماران مبتلا به سرطان پروستات و افراد کنترل مشاهده نشده ولی فراوانی ژنوتایپ AA در بیماران مبتلا به سرطان پروستات با متاستاز استخوانی در مقایسه با بیماران فاقد متاستاز، به میزان چشمگیری افزایش یافته است (۲۸). جستجوهای صورت گرفته

References:

- 1-Nabi SA, Kasetti RB, Sirasanagandla S, Tilak TK, Kumar MV, Rao CA. *Antidiabetic and Antihyperlipidemic Activity of Piper Longum Root Aqueous Extract in STZ Induced Diabetic Rats*. BMC Complement Altern Med 2013; 13(1): 37.
- 2-Doria A. *Genetics of Diabetes Complications*. Curr Diab Rep 2010; 10(6): 467-75.
- 3-Adamis A. *Is Diabetic Retinopathy an Inflammatory Disease?* Br J Ophthalmol 2002; 86(4): 363-5.
- 4-Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. *A Common Polymorphism in the 5'-Untranslated Region of the VEGF Gene is Associated with Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes*. Diabetes 2002; 51(5): 1635-9.
- 5-Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. *Retinopathy in Diabetes*. Diabetes Care 2004; 27 Suppl 1(suppl 1): S84-7.
- 6-Doria A. *Genetics of Diabetes Complications*. Curr Diabet Rep 2010; 10(6): 467-75.
- 7-Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. *Management of Diabetic Retinopathy: A Systematic Review*. JAMA 2007; 298(8): 902-16.

- 8-Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, et al. *Erythropoietin as a Retinal Angiogenic Factor in Proliferative Diabetic Retinopathy*. *New Engl J Medicine* 2005; 353(8): 782-92.
- 9-Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. *Progenitor Cell Trafficking is Regulated by Hypoxic Gradients Through HIF-1 Induction of SDF-1*. *Nat Med* 2004; 10(8): 858-64.
- 10-Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Regulation of Angiogenesis by Hypoxia: Role of the HIF System*. *Nat Med* 2003; 9(6): 677-84.
- 11-Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al. *Hyperglycemic Pseudohypoxia and Diabetic Complications*. *Diabetes* 1993; 42(6): 801-13.
- 12-Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, et al. *Hypoxia-Inducible Factor 1 and VEGF Upregulate CXCR4 in Glioblastoma: Implications for Angiogenesis and Glioma Cell Invasion*. *Lab Invest* 2006; 86(12): 1221-32.
- 13-Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Reza R, Marquez LA, Christofidou-Solomidou M, et al. *The SDF-1- CXCR4 Axis Stimulates VEGF Secretion and Activates Integrins but Does Not Affect Proliferation and Survival in Lymphohematopoietic Cells*. *Stem Cells* 2001; 19(5): 453-66.
- 14-Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, et al. *Hypoxia-Inducible Factor 1 and VEGF Upregulate CXCR4 in Glioblastoma: Implications for Angiogenesis and Glioma Cell Invasion*. *Laboratory Investigation* 2006; 86(12): 1221-32.
- 15-Liao YC, Lin HF, Rundek T, Cheng R, Guo YC, Sacco RL, et al. *Segment-Specific Genetic Effects on Carotid Intima-Media Thickness: The Northern Manhattan Study*. *Stroke* 2008; 39(12): 3159-65.
- 16-Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, Elnor SG, Elnor VM. *Role of MCP-1 and MIP-1 in Retinal Neovascularization during Postischemic Inflammation in a Mouse Model of Retinal Neovascularization*. *J Leuk Biol* 2003; 73(1): 137-44.
- 17-Crawford TN, Alfaro I, Kerrison JB, Jablon EP. *Diabetic Retinopathy and Angiogenesis*. *Current Diabetes Reviews* 2009; 5(1): 8-13.
- 18-Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. *Primer3--New Capabilities and Interfaces*. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(15): 115.
- 19-Qin LF, Qin JM, Zhang JQ, Lv XP, Huang LY, Wang JJ. *CXCL12 and CXCR4 Polymorphisms and Expressions in Peripheral Blood from Patients of Hepatocellular Carcinoma*. *Future oncol* 2018; 14(13): 1261-71.
- 20-Dalan B, Timirci-Kahraman O, Gulec-Yilmaz S, Altinkilic EM, Duman S, Ayhan H, et al. *Potential Protective Role of SDF-1 and CXCR4 Gene Variants in the Development of Dementia*. *Psychiatr Danub* 2020; 32(1): 92-6.
- 21-Zheng Q, Shuai X, Ye Y, Jin Y, Jiang N, Chen X, et al. *The Role of Polymorphisms of Stromal-Derived Factor-1 and Cxc Receptor 4 in Acute*

- Myeloid Leukemia and Leukemia Cell Dissemination*. Gene 2016; 588(2): 103-8.
- 22-Lee YL, Kuo WH, Lin CW, Chen W, Cheng WE, Chen SC, et al. *Association of genetic polymorphisms of CXCL12/SDF1 gene and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and prognosis of non-small cell lung cancer*. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands). 2011;73(2):147-52.
- 23-Derakhshan R, Arababadi MK, Ahmadi Z, Karimabad MN, Salehabadi VA, Abedinzadeh M, et al. *Increased Circulating Levels of SDF-1 (CXCL12) in Type 2 Diabetic Patients are Correlated to Disease State but are Unrelated to Polymorphism of the SDF-1 β Gene in the Iranian Population*. Inflammation 2012; 35(3): 900-4.
- 24-Dhamodharan U, Viswanathan V, Krishnamoorthy E, Rajaram R, Aravindhan V. *Genetic Association of IL-6, TNF-A and SDF-1 Polymorphisms with Serum Cytokine Levels in Diabetic Foot Ulcer*. Gene 2015; 565(1): 62-7.
- 25-Rizvi S, Raza ST, Mahdi F, Singh SP, Rajput M, Rahman Q. *Genetic Polymorphisms in KCNJ11 (E23K, Rs5219) and SDF-1 β (G801A, Rs1801157) Genes are Associated with the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus*. Br J Biomed Sci 2018; 75(3): 139-44.
- 26-Yin Q, Sun K, Xiang X, Juan J, Cao Y, Song J, et al. *Identification of Novel CXCL12 Genetic Polymorphisms Associated with Type 2 Diabetes Mellitus: A Chinese Sib-Pair Study*. Genetic Testing and Molecular Biomarkers 2019; 23(7): 435-41.
- 27-Cai C, Wang LH, Dong Q, Wu ZJ, Li MY, Sun YH. *Association of CXCL12 and CXCR4 Gene Polymorphisms with the Susceptibility and Prognosis of Renal Cell Carcinoma*. Tissue antigens 2013; 82(3): 165-70.
- 28-Işman FK, Kucukgergin C, Daşdemir S, Cakmakoglu B, Sanli O, Seckin S. *Association Between SDF1-3'A or CXCR4 Gene Polymorphisms with Predisposition to and Clinicopathological Characteristics of Prostate Cancer with or without Metastases*. Mol Biol Reports 2012; 39 (12): 11073-9.

Association of *CXCL12* and *CXCR4* Genes Polymorphism with Proliferative Diabetic Retinopathy in Diabetic Patients

Saba Gharibi^{1,2}, Shiva Aghaei³, Ensieh Shahvazian⁴, Mohammad Bagher Mahmoodi⁴,
Mohammad Hossein Sahami-Fard¹, Parisa kolaoudouz¹, Ehsan Farashahi Yazd³

Original Article

Introduction: Patients with diabetes are prone to develop complications related to the retina. So far, several genes have been reported in connection with the progression of retinopathy, and a group of these genes is genes involved in angiogenesis. *CXCL12* and *CXCR4* genes are among the most important genes in this path, which have been less studied and investigated. The aim of this study was to determine the relationship between polymorphism of *CXCL12* (rs1801157) and *CXCR4* (rs2228014) genes and the risk of proliferative diabetic retinopathy in the population of Yazd City.

Methods: In the present case-control study, rs2228014 and rs1801157 polymorphisms were investigated among 103 patients with diabetes in two groups, case and control. In this study, the control group included 49 diabetic patients who did not show retinopathy complications, and the case group consisted of 54 diabetic patients with proliferative retinopathy complications. The Genotyping of rs2228014 polymorphism was examined by ARMS-PCR method and rs1801157 variant by RFLP-PCR technique. The statistical analysis of data was conducted using SPSS software version 16 and chi-square test.

Results: Our results represented no association among the rs1801157 and rs2228014 polymorphisms and the risk of proliferative diabetic retinopathy ($P>0.05$).

Conclusion: This study did not confirm association of the rs1801157 and rs2228014 polymorphisms with proliferative diabetic retinopathy and further studies are required to investigate the correlation of polymorphisms of interest with PDR.

Keywords: Proliferative Diabetic retinopathy, Polymorphism, *CXCL12*, *CXCR4*.

Citation: Gharibi S, Aghaei SH, Shahvazian E, Mahmoodi M.B, Sahami-Fard M.H, kolaoudouz P, Farashahi Yazd E. Association of *CXCL12* and *CXCR4* Genes Polymorphism with Proliferative Diabetic Retinopathy in Diabetic Patients. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 30(7): 5032-41.

¹Department of Medical Genetics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.

²Diabetes Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

³Stem Cell Biology Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

⁴Research and Development Division, Roje Technology, Yazd, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09132583056, email: ehsanfarashahi@ssu.ac.ir