

ارتباط واریانت ژنتیکی rs4252499 در ژن TRPV5 با بیماری سنگ کلیه

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۵

خلاصه

مقدمه: بیماری سنگ کلیه نوعی اختلال بالینی است که نشان می‌دهد، کاهش یون کلسیم و افزایش ROS منجر به آسیب بافت کلیه می‌شود. پروتئین TRPV5 به‌عنوان تنظیم‌کننده ROS در سلول عمل می‌کند. هدف از این مطالعه، بررسی همراهی واریانت ژنتیکی rs4252499 در ژن TRPV5 با استعداد ابتلا به بیماری سنگ کلیه است.

روش کار: در یک مطالعه موردی-شاهدی مطالعه بر روی ۱۰۰ فرد مبتلا به سنگ کلیه و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انجام گرفت. پس از استخراج DNA از نمونه‌های خون محیطی، تعیین ژنوتیپ با روش T-ARMS انجام گرفت. همچنین آنالیز و رگرسیون برای مقایسه فراوانی آللی ژنوتیپ‌های میان گروه کنترل و بیمار استفاده گردید.

نتایج: ارتباط معناداری میان ژنوتیپ (AA(OR:2/59,95%CL:1/63-4/13,p:0/036) و استعداد ابتلا به بیماری سنگ کلیه وجود داشت. آنالیز داده‌ها نشان داد که آلل A ریسک بروز بیماری را افزایش می‌دهد. **نتیجه‌گیری:** در این مطالعه برای نخستین بار، همراهی واریانت ژنتیکی rs4252499 در ژن TRPV5 در بیماری سنگ کلیه بررسی شد. نتایج نشان داد که واریانت ژنتیکی rs4252499 در ژن TRPV5 با بیماری سنگ کلیه همراهی دارد. مطالعه بیشتر در اقلیم‌های مختلف با واریانت‌های ژنتیکی متفاوت برای تأیید مطالعه حاضر لازم است.

کلمات کلیدی: سنگ کلیه، TRPV5، واریانت ژنتیکی، کلسیم

زهرا مدرس^۱

حیدر آقابابا^{۱*}

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران.

Email:
mojtabamohammadjalai@gmail.com

پی‌نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

سنگ کلیه یک اختلال شایع است که حاصل عدم تحلیل مواد معدنی مختلف در ادرار است که با درد در پهلو، کشاله ران و خون در ادرار مشخص می‌شود (۱). این اختلال ۱۵-۵ درصد جمعیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۶) که در هر دو جنسیت (زن و مرد) روند افزایشی دارد، ولی در مردان بیش از زنان بروز می‌کند (۳). شیوع این بیماری در مناطق و گروه‌های سنی متفاوت است (۴). اطلاعات حاصل از بررسی خانواده‌ها در طی چند دهه گذشته، نشان از نقش سابقه خانوادگی در بروز بیماری سنگ کلیه دارد که این فاکتور از جمله عوامل بسیار مهم در بروز این بیماری است. علاوه بر این می‌توان از مواردی هم چون اختلال سیستمیک و عوامل محیطی نیز نام برد (۳). تحقیقات گوناگون در مورد مکانیسم پاتوفیزیولوژی بیماری سنگ کلیه، فرآیندهای پیچیده‌ای را نشان می‌دهد. بر اساس شواهد موجود اشباع ادراری، تبلور، کمپلوسور از جمله عوامل مؤثر بر بیماری سنگ کلیه هستند (۵). پروتئین‌های TRPV (Transient receptor potentiation) vaneloyed متعلق به خانواده پروتئین‌های انتقال دهنده کلسیم هستند و برای کانال حسگر اسمز و گرما، گیرنده، وانیلوئید و کانال TRPV انتخابی کلسیم (۶)، و جلوگیری از استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) Reactive Oxygen Species اهمیت دارند (۷).

TRPV5 عمدتاً در سلول‌های اپیتلیال کلیه وجود دارد که کلسیم را به خود جذب می‌کند (۸). و هنگامی که سطح کلسیم داخلی پائین باشد فعال می‌شود (۹). نقص در عملکرد انتقال کلسیم سبب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود، که نتیجه آن استرس اکسیداتیو، آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در سلول است. تحقیقات، وجود آسیب اکسیداتیو در بافت‌های مبتلایان به بیماری سنگ کلیه را نشان می‌دهد (۷). ژن TRPV5 در موقعیت کروموزومی 7q34 قرار دارد (۱۰). واریانت ژنتیکی rs4252499 می‌تواند باعث افزایش انتقال Ca^{2+} در پروتئین حاصل شود (۱۱). مطالعات اخیر از سوی هولمز و همکارانش نشان داد که میزان بیان کلسیم در ژن TRPV5 در بیماران مبتلا به سنگ کلیه نسبت به افراد نرمال کاهش می‌یابد (۱۲). بنابراین با توجه به نقش انتقال دهنده TRPV5 در تنظیم عملکرد کلسیم از

یک سو و همچنین تأثیر پلی مورفیسم rs4252499 بر میزان عملکرد حاصل از ژن TRPV5 از سوی دیگر، در این مطالعه اثر واریانت ژنتیکی rs4252499 ژن TRPV5 بر ابتلا به بیماری سنگ کلیه بررسی شد.

روش کار

این مطالعه از نوع مورد-شاهدی است که بر روی ۲۰۰ نفر (۱۰۰ بیمار دارای سنگ کلیه و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل)، انجام شد. افراد گروه کنترل و بیمار از لحاظ سن (± 14) و جنس همسان سازی شدند که نتایج در جدول ذیل آورده شده است.

جدول شماره ۱. مشخصات دو گروه مورد مطالعه

خصوصیات	کنترل	بیمار	P ⁺
تعداد کل (نفر)	۱۰۰	۱۰۰	-
میانگین سن (سال)	۴۵/۸۹ ± ۱۴/۲۶	۴۵/۱ ± ۱۴/۰۷	۰/۶۶
دامنه سنی (سال)	۲۳-۸۶	۲۳-۹۰	-

پس از تکمیل فرم رضایت نامه آگاهانه، نمونه‌های خون گروه بیمار در بیمارستان شهید فقیهی شیراز توسط متخصصین بخش اورولوژی و نمونه‌های سالم نیز از مرکز انتقال خون شیراز گرفته شد. معیار ورود به مطالعه در گروه بیمار شامل افرادی بودند که به وسیله پزشک متخصص، تشخیص قطعی سنگ کلیه در بیماران داده شده بود و کسانی که دارای مواردی همچون عفونت مجاری، نقرص، سرطان و دیابت بودند، از مطالعه حذف شدند. به منظور تعیین ژنوتیپ افراد مورد مطالعه، ۵ سی‌سی خون از آنها گرفته شد و برای جلوگیری از انعقاد نمونه‌ها، آن‌ها را به تیوب‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA منتقل گردید و پس از آن به آزمایشگاه، در فریزر ۲۰- درجه انتقال دادیم. استخراج DNA به روش Salting out انجام شد. تعیین ژنوتیپ‌ها به کمک تکنیک T-ARMS PCR صورت گرفت. واکنش T-ARMS PCR در حجم نهایی $12/5 \mu L$ شامل master mix pcr6/25 μL شرکت یکتا تجهیز آزما، $1 \mu L$ از پرایمرهای FORWARD و REVERS با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، $1 \mu L$ DNA استخراج شده، $125 \mu L$ آب مقطر انجام شد. توالی پرایمر استفاده شده در جدول شماره ۲ آمده است.

از آنالیز آماری χ^2 ، رگرسیون لجستیک و محاسبه OR با فاصله اطمینان ۹۵ درصد انجام شد، همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از T-test به کمک نرم افزار SPSS-16 بررسی گردید.

نتایج

تعداد کل افراد مورد مطالعه در این تحقیق ۲۰۰ نفر با دامنه سنی ۹۰-۲۳ سال و میانگین سنی $45/01 \pm 14/07$ سال بود. گروه بیمار شامل ۷۰ زن و ۳۰ مرد مبتلا به بیماری سنگ کلیه و گروه کنترل نیز شامل ۳۷ زن و ۶۳ مرد بود.

جدول شماره ۱ مشخصات سنی دو گروه مورد مطالعه را نشان می‌دهد. مقایسه میانگین سنی در دو گروه کنترل و بیمار نشان داد که اختلاف آماری معناداری میان میانگین سنی در دو گروه مورد مطالعه وجود ندارد ($P=0/85$). توزیع ژنوتیپ‌ها و فراوانی آللی واریانت rs4252499 در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳. بررسی ارتباط واریانت ژنتیکی rs4252499 در ژن TRPV5 با خطر ابتلا به بیماری سنگ کلیه

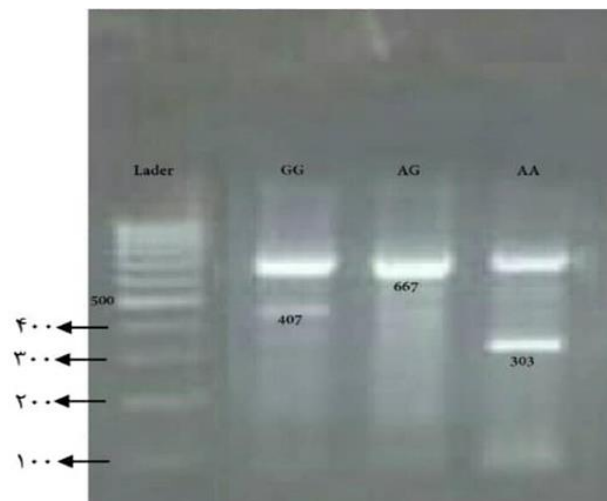
P ⁺	OR (95%CL)	n=100	n=100	rs4252499	
		بیمار	کنترل	GG	AG
-	رفرنس	۵۴	۶۷	GG	
۰/۶۰۶	۰/۸۴ (۰/۴۳ - ۱/۶۳)	۲۱	۳۱	AG	
<۰/۰۰۱	۶۸/۴۲ ۱۵/۵۱ (۳/۵۱)	۲۵	۲	AA	
-	رفرنس	۱۲۹ (۰/۶۴)	۱۶۵ (۰/۸۲)	G	
۰/۰۳۶	۲/۵۹ (۱/۶۳ - ۴/۱۳)	۷۱ (۰/۳۵)	۳۵ (۰/۱۷)	A	آلل

بررسی توزیع ژنوتیپ‌ها در گروه کنترل ($\chi^2: 54/0$, df: 1, p: 46/0) و بیمار ($\chi^2: 29/31$, df: 1, p: 0) در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارند. بررسی ارتباط میان ژنوتیپ‌های واریانت rs4252499 با خطر ابتلا به بیماری سنگ کلیه نشان داد که در ژنوتیپ AA ($P < 0/001$)، $OR: 68/42$, $CL: 3/51$, $OR: 15/51$ ارتباط معناداری با استعداد ابتلا به بیماری سنگ کلیه وجود دارد. همچنین مشخص شد که در مدل ژنتیک غالب A، افراد دارای آلل A در خطر بیشتری برای ابتلا به خط بیماری سنگ کلیه هستند - $OR: 2/59$, $95\%CL: 1/63$ - ($4/13$, $p: 0/036$).

جدول ۲. توالی پرایمرهای استفاده شده برای واکنش T-ARMS PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر "۵ به ۳"
rs4252499 -FI	۵ CAGTGTCAACTTCGCATTCA 3
rs4252499 -RI	۵ CAGTGTGGCAATGAGGGC 3
rs4252499 -FO	ATAGTACATCTTAGGGTTAGACA ۵ G 3
rs4252499 -RO	CTCCTTCTGTACCTTCCATTTATC ۵ 3

برنامه دمایی وزمانی PCR T-ARMS شامل دناتوراسیون اولیه بادمای ۹۵C به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون با دمای ۹۵C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال دمای ۴۵ ثانیه و طولیل سازی با دمای ۷۲C به مدت ۴۵ ثانیه صورت گرفت. واکنش PCR T-ARMS با مرحله طولیل سازی نهایی با دمای ۷۲C به مدت ۵ دقیقه به پایان رسید و نمونه‌ها در دمای ۴C نگهداری شد. پس از الکتروفورز نمونه آلل G، قطعه 407 bp و آلل A، قطعه 302 bp را روی ژل آگارز ۲ درصد نشان دادند. شکل شماره ۱، روش تعیین ژنوتیپ نمونه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



عکس ۱. تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم rs4252499 TRPV5 توسط تفکیک T-ARMS PCR: مارکر 100 bp، آلل A دارای محصولی به طول 302 bp و آلل G دارای محصولی به طول 407 bp را روی ژل آگارز نشان می‌دهد. ارتباط میان ژنوتیپ‌های واریانت ژنتیکی rs4252499 ژن TRPV5 با استعداد ابتلا به بیماری سنگ کلیه، با استفاده

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر برای نخستین بار، واریانت ژنتیکی rs4252499 در ژن TRPV5 در افراد مبتلا به بیماری سنگ کلیه، در مقایسه با افراد سالم بررسی می‌شود. نتایج نشان داد که ارتباط معناداری میان این واریانت ژنتیکی و استعداد ابتلا به بیماری سنگ کلیه وجود دارد. افراد حاصل آلل A، در خطر بیشتری برای ابتلا به بیماری سنگ کلیه قرار دارند. نقش و چگونگی عملکرد کلسیم، استرس اکسیداتیو، آسیب اکسیداتیو سلول در این بیماری به اثبات رسیده است. به خوبی مشخص است که کاهش کلسیم درون سلولی، تولید ROS را افزایش می‌دهد و افزایش این شیب به وسیله TRPV5 نقش بسیار مهمی در کاهش تولید ROS دارد. پروتئین TRPV5 به طور گسترده در انواع بافت‌های بدن بیان می‌شود و نقش مهمی در پاتولوژیک گوناگون مانند، فشارخون، دیابت، عفونت و بالا بودن کلسترول خون دارد (۷). پارک و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که رادیکال‌های آزاد باعث آسیب توبولار کلیوی می‌شود، که همین امر منجر به بیماری سنگ کلیه می‌شود (۱۶). همچنین پژوهش اخیر در سال ۲۰۱۲ از سوی عین‌اللهی و همکارانش نشان داد، استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و تغییرات در مواد ترکیبی ادرار، در ایجاد بیماری سنگ کلیه مؤثر هستند (۱۷). در انواع پروتئین‌های خانواده TRPV،

پروتئین TRPV5 به طور عمده در روده، کلیه و جفت بیان می‌شود (۱۸). یون کلسیم به واسطه TRPV5 به کالبدین D28K متصل شده در نهایت به کمک دیناسین و کلاترین درونی سازی می‌شود و از طریق وزیکول و سپس اندوزوم تجزیه یا بازیافت می‌شود (۱۹). گور و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که وجود TRPV5 در فرآیندهایی همچون انتقال کلسیم در روده باعث تنظیم کلیه می‌شود، که این خود باعث تنظیم سرعت جذب و ذخیره و دفع در آن می‌شود. کانال کلسیم، TRPV5 را در سطح رونویسی، بیان غشایی و عملکرد کنترل می‌کند (۲۰). در مطالعات گوناگون در ارتباط میان واریانت rs 4252499 و ایجاد تغییر عملکرد، انتقال Ca^{2+} و همچنین تغییر T463A در ژن TRPV5 گزارش شده است و اثبات شد که واریانت rs4252499 در ژن TRPV5 می‌تواند منجر به تغییر در بیان عملکرد پروتئین حاصل شود (۱۱). در پژوهش حاضر برای نخستین بار ارتباط این واریانت ژنتیکی با ابتلا به بیماری سنگ کلیه مطالعه و بررسی گردید و به دست آمد که واریانت ژنتیکی rs4252499 در ژن TRPV5 با استعداد ابتلا به بیماری سنگ کلیه مرتبط است. برای تکمیل نتایج پژوهش پیشنهاد می‌شود که مطالعه در اقلیم‌های متفاوت با واریانت‌های ژنتیکی مختلف، مقایسه شود که تأییدی بر نتایج مطالعه حاضر باشد

References

- 1-Preminger GM. Stones in the urinary track. In: cutler RE (ed.) the merck manual medical information home edition (3rd ed.). whitehouse station, new jersey. 2007.
- 2.Barnela SR, Soni SS, Saboo SS, Bhansali AS. Medical management of renal stone. Indian J Endocrinol Metab. 2012, Mar; 16(2):236-9.
- 3.Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. J Clin Endocrinol Metab, 2012 Jun; 97(6):1847-60.
- 4.Safarinejad MR. The epidemiology of adult chronic kidney disease in a population-based study in Iran: prevalence and associated risk factors. J Nephrol. 2009 Jan-Feb; 22(1):99-108.
- 5.Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. Toxicology, 2004 Feb 15; 195(2-3):221-30.
- 6.Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. 1969 Oct 18; 224(5216):285-7.
- 7.Huang HS, Chen J, Chen CF, Ma MC. Vitamin E attenuates crystal formation in rat kidneys: Roles of renal tubular cell death and crystallization inhibitors. Kidney Int, 2006; 70(4):699-710.
- 8.Renkema KY, Lee K, Topala CN, Goossens M, Houillier P, Bindels RJ, et al. TRPV5 gene polymorphisms in renal hypercalciuria. Nephrol Dial Transplant. 2009; 24(6):1919-24.
- 9.Wang L, Holmes RP, Peng JB. Modeling the structural and dynamical changes of the epithelial calcium channel TRPV5 caused by the A563T variation based on the structure of TRPV6. J Biomol Struct Dyn. 2018; 3:1-24.
- 10.Wikipedia.org. {Homepage on the Internet}. Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5. {Updated on 29 June 2018, at 16:10(UTC)}. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/TRPV5>.

11. Wang L, Holmes R, Peng j, MOlecular Modeling of the Structural and Dynamical Changes in Calcium Channel TRPV5 Induced by the African-Specific A563T Variation. *Biochemistry*. 2016;55(8):1254-1264.
12. Wang L, Holmes R, Peng j. The L530R variation associated with recurrent kidney stones impairs the structure and function of TRPV5. *Biochem and biophys res com*. 2017;492(3):362-367.
13. Einollahi B, Naghii MR, Sepandi M. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with urolithiasis. *Endocr Regul*, 2013 Jan; 47(1):27-32.
14. Balaji KC, Menon M. Mechanism of stone formation. *Urol Clin North Am*. 1997 Feb; 24(1):1-11.
15. Wu Y, Miyamoto T, Li K, Nakagomi H, Sawada N, Kira S, et al. Decreased expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 and TRPV6 in human renal cell carcinoma associated with vitamin D receptor. *J Urol*. 2011;186(6):2419-25.
16. Lingyun Wang, Ross P. Holmes, b and Ji-Bin peng. The L530R variation associated with recurrent kidney stones impairs the structure and function of TRPV5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Oct 21; 492(3): 362-367.
17. Tao Na, Wei Zhang, Yi Jiang, Youyou Liang, He-Ping Ma, David G. Warnock, et al. The A563T variation of The renal epithelial calcium channel TRPV5 among Africa Americans enhances calcium influx. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 May; 296(5): F1042-F1051.

*Original Article***Association of rs4252499 polymorphisms of the *TRPV5* gene with kidney stone disease of unknown etiology**

Received: 12/10/2022 - Accepted: 16/07/2023

Zohreh Modares¹
Heydar Aqababa^{1*}¹ Department of Biology, Arsanjan branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran.Email:
mojtabamohammadjalai@gmail.com**Abstract**

Introduction and purpose: Kidney stone disease is they third most important urological disease, which is considered as a universal problem. The similarity indicates that reactive oxygen species are produced in kidney stone. oxidative stress can play an important role in affecting this gene and ultimately in the pathogenesis of several diseases including kidney stone. Oxygen species, peroxidation products, lipids, enzyme indices and indicators of renal epithelial damage are considered as indicators of many chronic kidney diseases. The *TRPV5* gene plays an important role in calcium absorption and acts as a transporter. The purpose of this study is to study the relationship between the rs4252499 and rs4236480 polymorphisms of the TRPV5 gene and susceptibility to kidney stone.

Methodology: In this case -control stu100 patients (average age=14.07±45.01) and 100 normal people (average age= 45.89±14.26) were evaluated. A 5cc of blood samples were taken from each person. They genotype determination was done using T-ARMS method.

Findings: Data analysis was done using SPSS16 software. Participant's general information's were collected using Questionnaire forms. The results of this research in molecular level showed that for rs4252499. A factor increases the risk of kidney stone disease and for rs4236480, kidney stone disease probability is increased in presented of heterozygote genotype. Respectively(OR:2.59,95%CL:1.4-63.13,P=0.036)AND (OR:2.18,95%CL:1.17-4.07,P=0.014).

rs4252499 and rs4236480 polymorphisms of the *TRPV5* gene are associated with susceptibility to kidney stone disease. relationship between anxiety sensitivity and most of the cognitive beliefs.

Key words: kidney stone, Oxidative Stress, Polymorphism

Acknowledgement: There is no conflict of interest