



The relationship between some SLC30A8 gene polymorphisms and fasting blood sugar and HOMA-IR in patients with type 2 diabetes in an Iranian population in the east of Mazandaran province

Mehran Ahmadi

PhD., student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Mehranahmadi999@yahoo.com

Abdolkarim Mehrvarz

Ph.D., Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (Corresponding author). kmahrooz2@gmail.com

Saeid Abediankenari

Ph.D., Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. abedianlab@yahoo.co.uk

Nasim Hayati Roodbari

Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Convergent Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. hayati@srbiau.ac.ir.

Abstract

Objective: Several studies have reported the role of genetic polymorphisms in the onset and development of type 2 diabetes. SLC30A8 is one of the loci containing polymorphism that is associated with the risk of type 2 diabetes. This gene encodes zinc transporter (ZnT8). In this research, the relationship of some polymorphisms of this gene with fasting blood sugar level and HOMA-IR in patients with type 2 diabetes in a population from the east of Mazandaran province was investigated.

Materials and methods: 133 patients with type 2 diabetes and 128 controls were evaluated in this study. Insulin and fasting blood glucose levels were used to determine HOMA-IR. RFLP-PCR was used to identify rs13266634 and rs11558471 polymorphisms.

Findings: The results showed that for rs11558471 polymorphism, both fasting glucose and HOMA-IR were higher in GA+AA group compared to GG homozygotes ($p < 0.001$). Also, for rs13266634 polymorphism, both fasting glucose and HOMA-IR were higher in CT+CC group compared to TT homozygotes ($p < 0.001$).

Conclusion: The results of this study showed that rs13266634 and rs11558471 polymorphisms are related to blood sugar characteristics in this Iranian population with type 2 diabetes. This association may be useful for identifying individuals at high risk of developing type 2 diabetes. Of course, to better understand this relationship, it is necessary to study these polymorphisms in other populations with a larger sample size.

Keywords: Type 2 diabetes, SLC30A8, rs13266634, rs11558471, Insulin, Single nucleotide polymorphism, Blood sugar.

Received: 2023/06/18 ; Revised: 2023/08/01 ; Accepted: 2023/09/10 ; Published online: 2023/12/26

Cite: Ahmadi, M., Mehrvarz, A., Abediankenari, S. & Hayati Roodbari, N. (2023). The relationship between some SLC30A8 gene polymorphisms and fasting blood sugar and HOMA-IR in patients with type 2 diabetes in an Iranian population in the east of Mazandaran province. *Applied Biology*, 13(4), p. 5-20.

Article type: Research Article

© the authors

Publisher: Qom Islamic Azad University





ارتباط بعضی پلی مورفیسم‌های ژن $SLC30A8$ با قند خون ناشتا و $HOMA-IR$ بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در یک جمعیت ایرانی در شرق استان مازندران

مهران احمدی

دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
mehranahmadi999@yahoo.com

عبدالکریم مهروز

دکتری، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران (نویسنده مسئول).
kmahrooz2@gmail.com

سعید عابدیان کناری

دکتری، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
abedianlab@yahoo.co.uk

نسیم حیاتی رودباری

دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
hayati@srbiau.ac.ir

چکیده

هدف: مطالعات متعددی نقش پلی مورفیسم‌های ژنتیکی را در شروع و توسعه دیابت نوع ۲ گزارش کرده‌اند. $SLC30A8$ یکی از جایگاه‌های حاوی پلی مورفیسم است که با خطر دیابت نوع ۲ مرتبط می‌باشد. این ژن، انتقال‌دهنده روی ($ZnT8$) را رمزگذاری می‌کند. در این تحقیق ارتباط بعضی پلی مورفیسم‌های این ژن با سطح قند خون ناشتا و $HOMA-IR$ در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیتی از شرق استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت.

روش: ۱۳۳ بیمار مبتلا به دیابت به دیابت نوع ۲ و ۱۲۸ فرد شاهد در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفتند. انسولین و سطوح گلوکز خون ناشتا برای تعیین $HOMA-IR$ استفاده شدند. برای شناسایی پلی مورفیسم‌های rs13266634 و rs11558471 از RFLP-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد برای پلی مورفیسم rs11558471، هر دو مورد گلوکز ناشتا و $HOMA-IR$ در گروه $GA+AA$ در مقایسه با هموزیگوت‌های GG بالاتر بودند ($p < 0.001$). همچنین برای پلی مورفیسم rs13266634 هم گلوکز ناشتا و هم $HOMA-IR$ در گروه $CT+CC$ در مقایسه با هموزیگوت‌های TT بالاتر بودند ($p < 0.001$).

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۸؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۵/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۶؛ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

استاد به این مقاله: احمدی، مهران؛ مهروز، عبدالکریم؛ عابدیان کناری، سعید؛ حیاتی رودباری، نسیم (۱۴۰۲). ارتباط بعضی پلی مورفیسم‌های ژن $SLC30A8$ با قند خون ناشتا و $HOMA-IR$ بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در یک جمعیت ایرانی در شرق استان مازندران. *بیولوژی کاربردی*، ۱۳(۴)، ص ۵-۲۰.

نوع مقاله: پژوهشی

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه قم



نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پلی مورفیسم‌های rs13266634 و rs11558471 با ویژگی‌های قند خون در این جمعیت ایرانی مبتلا به دیابت نوع ۲ ارتباط دارد. این ارتباط ممکن است برای شناسایی افراد در معرض خطر بالای ابتلا به دیابت نوع ۲ مفید باشد. البته برای درک بهتر این ارتباط، مطالعه این پلی مورفیسم‌ها در جمعیت‌های دیگر با حجم نمونه بزرگ‌تر لازم است.

کلیدواژه‌ها: دیابت نوع ۲، SLC30A8، rs13266634، rs11558471 انسولین، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، قند خون، استان مازندران، دیابت نوع ۲.

۱. مقدمه

دیابت نوع ۲ شایع‌ترین و از نظر بالینی مهم‌ترین اختلال متابولیک است که در دهه‌های اخیر به یک بیماری همه‌گیر جهانی تبدیل شده و یک مشکل عمده مراقبت‌های بهداشتی در سراسر جهان است. میزان ابتلا به دیابت نوع ۲ همچنان در حال افزایش است و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۳۵ بیش از ۵۹۰ میلیون بیمار مبتلا به این بیماری تشخیص داده شوند (۱، ۲). سازمان بهداشت جهانی (WHO) دیابت را به عنوان یک اختلال متابولیک با علت چندگانه که با هیپرگلیسمی مزمن با اختلال متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین ناشی از نقص در ترشح انسولین، عملکرد انسولین یا هر دو تعریف می‌کند. تخمین زده می‌شود ۹۰ درصد از بیماران دیابتی مبتلا به دیابت نوع ۲ تشخیص داده شده و اکثر ۱۰ درصد باقیمانده از بیماران، دیابت نوع ۱ دارند، اگرچه انواع نادر دیگری نیز وجود دارد (۳، ۴). دیابت نوع ۲ عمدتاً توسط ترشح ناکافی انسولین توسط سلول‌های بتای پانکراس و همچنین مقاومت به انسولین در بافت محیطی ایجاد می‌شود (۵، ۶). علت‌شناسی دیابت نوع ۲ تا حد زیادی به رژیم‌های غذایی مرتبط با مصرف بیش از حد مواد مغذی و مصرف انرژی ناکافی در بدن مرتبط است (۷). طیف وسیعی از درمان‌های مؤثر در سطح جهانی برای کاهش هیپرگلیسمی در بیماران دیابت نوع ۲ وجود دارد که اثرات خود را با بهبود ترشح انسولین یا کاهش مقاومت به انسولین بافت محیطی ایجاد می‌کنند (۸). با وجود این، عوارض پس از تشخیص، به ویژه عوارض طولانی مدت، در سطح جهانی شایع است. در نتیجه، دیابت یکی از علل اصلی نابینایی، بیماری کلیوی، قطع عضو اندام تحتانی و بیماری‌های قلبی عروقی است (۳). ژنتیک نقش بسیار مهمی در ایجاد دیابت نوع ۲ دارد. شایع‌ترین اشکال دیابت نوع ۲، پلی ژنتیکی است. بنابراین، در این بیماری، تغییراتی در چندین ژن وجود دارد، اما برخی از اشکال نادر دیابت نیز وجود دارد که ناشی از جهش تک ژنی بوده که به دیابت تک ژنی معروف است (۹).

یکی از ژن‌هایی که نقش مهمی را در دیابت نوع ۲ ایفا می‌کند، SLC30A8 است که ناقل (ترانسپورتر) روی با نام ZnT8 را کد می‌کند. متداول‌ترین جایگاه پلی مورفیسم در SLC30A8 جایگاه rs13266634 است. این پلی مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی توسط جابجا شدن آمینواسید آرژینین با آمینواسید تریپتوفان منجر به دیابت نوع ۲ می‌شود (۱۰). ژن SLC30A8 در کروموزوم 8q24.11 قرار دارد و یک ناقل ۳۶۹ اسیدآمینو روی (ZnT) را رمزگذاری می‌کند که مسئول انتقال روی به گرانول‌های ترشح‌کننده انسولین سلول بتا است (۱۱، ۱۲). ZnT8 تقریباً در سلول‌های آلفا و بتا پانکراس بیان می‌شود (۱۳). این ناقل ممکن است به خودایمنی دیابت نوع ۱ کمک کند و در نتیجه

آنتی بادی و سلول‌های T مرتبط در شروع و توسعه دیابت نوع ۱ متمایز شوند (۱۴). تغییر بیان λZnT در تعدیل ترشح انسولین نقش دارد (۱۵). کاهش ترشح انسولین تحریک شده با گلوکز در سلول‌های بتای پانکراس با کاهش λZnT مشاهده شده است (۱۶). به گفته هاردی و همکاران، از دست دادن کلی ژن λZnT در موش باعث تشدید چاقی، عدم تحمل گلوکز و مقاومت به انسولین در طول تغذیه با رژیم غذایی پر چرب می‌شود (۱۷).

مطالعات مربوط به ارتباط انواع ژن $\lambda SLC30A$ با دیابت نوع ۲ عمدتاً در مورد شایع‌ترین پلی مورفیسم یعنی $\lambda rs13266634$ بوده و ارتباط سایر پلی مورفیسم‌های ژن $\lambda SLC30A$ با دیابت نوع ۲ در جمعیت‌های مختلف، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۸). هدف تحقیق حاضر بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های $\lambda rs11558471$ و $\lambda rs13266634$ با قند خون ناشتا و HOMA-IR بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در یک جمعیت ایرانی در شرق استان مازندران بود. با توجه به اهمیت ژن $\lambda SLC30A$ در انتقال روی و اینکه پلی مورفیسم‌های مربوطه می‌توانند تاثیر متفاوتی در بروز بیماری دیابت نوع ۲ داشته باشند، نتایج این تحقیق می‌تواند در به‌کارگیری رویکردهای درمانی مرتبط با این بیماری تاثیرگذار باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نمونه‌های مورد مطالعه

این مطالعه بر روی ۱۳۳ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ (محدوده سنی $51/84 \pm 6/27$) و ۱۲۸ فرد شاهد (محدوده سنی $46/29 \pm 7/39$) انجام شد. اطلاعات مورد نیاز در مورد پارامترهای موثر، سوابق پزشکی، محیط زندگی شخصی و داروهای مصرفی افراد از همه شرکت‌کنندگان در تحقیق از طریق پرسشنامه دریافت شد. بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱، سکته قلبی یا مغزی، نارسایی کلیوی، بیماری کبدی و بیماری‌های مزمن و زنان باردار از مطالعه خارج شدند. برخی از آنها متفورمین، سولفونیل اوره و/یا استاتین مصرف می‌کردند. روش کار به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه رسید و مطابق اصول بیانیه هلسینکی انجام شد. قبل از ثبت نام، از شرکت‌کنندگان رضایت‌نامه کتبی آگاهانه دریافت شد. از هر فرد ۳ میلی‌لیتر خون محیطی به شکل لخته برای اندازه‌گیری سطح سرمی قند خون و انسولین و ۳ میلی‌لیتر خون حاوی ماده ضد انعقاد $\lambda EDTA K$ برای آزمایش PCR گرفته شد.

۲-۲. اندازه‌گیری سطح سرمی قند خون

اندازه‌گیری سطح سرمی قند به روش آنزیمی - رنگ‌سنجی گلوکز اکسیداز با استفاده از

دستگاه اتوانالایز رهیتاچی ۹۱۱ انجام شد. خلاصه مراحل بدین صورت می‌باشد که گلوکز توسط آنزیم گلوکز اکسیداز تبدیل به گلوکونیک اسید و H_2O_2 شده و در مرحله بعدی آب اکسیژنه با ۴-Aminoantipyrine و فنول توسط آنزیم پراکسیداز Quinoneimine تولید شد که در طول موج ۵۴۶ نانومتر، ماکزیمم جذب نوری را دارد. در ضمن برای تنظیم دستگاه از TruCalU و برای کنترل از TruLab P و TruLab N شرکت پارس آزمون استفاده گردید.

۲-۳. اندازه‌گیری سطح سرمی انسولین با روش ELISA

سنجش انسولین براساس روش ایمونوآنزیمومتری شامل آنتی بادی‌های اختصاصی و با تمایل بالا (Conjugated & Immobilized) می‌باشد که برای شناسایی اپیتوپهای متفاوت و متمایز کاربرد دارد. در این روش آنتی‌بادی علیه انسولین در ته پلیت چسبانده شده و سرم حاوی آنتی ژن (انسولین) اضافه شد و واکنش بین انسولین و آنتی‌بادی صورت گرفت. سپس آنتی بادی متصل شده با آنزیم پراکسیداز تریچه HRP, EC.I.II.I اضافه شد تا با انسولین اتصال ایجاد شود. در مرحله بعدی سوبسترای آنزیم (TMB) و H_2O_2 اضافه شد و آنزیم پروکسیداز، H_2O_2 را تجزیه کرده و همچنین سوبسترای TMB به رنگ آبی تغییر رنگ می‌دهد، که این تغییر رنگ با غلظت انسولین موجود در نمونه متناسب می‌باشد. از H_2SO_4 به عنوان محلول پایان‌دهنده واکنش استفاده شد که با ایجاد محیط اسیدی باعث ایجاد رنگ زرد می‌شود که نشان‌دهنده پایان واکنش می‌باشد. برای شستشو از دستگاه Microplate Washer مدل RT-۳۱۰۰ استفاده شد. همچنین مراحل آزمایش الایزا با دستگاه Awareness Microplate Reader مدل ۴۳۰۰ انجام شد. طول موج مورد استفاده ۶۲۰-۶۳۰ نانومتر بود.

غلظت گلوکز و انسولین ناشتا برای تعیین و ارزیابی مدل هومئوستازی برای مقاومت به انسولین (HOMA-IR) طبق رابطه زیر بدست آمد:

$$HOMA-IR = \text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) / 22.5$$

۲-۴. استخراج DNA و PCR

پرایمرها با استفاده از برنامه BatchPrimer ۳ طراحی شدند. اطلاعات مرتبط با ژن ASLC30A و پلی مورفیسم‌ها از وبسایت پایگاه داده‌ای (www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج شد. اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از Primer-BLAST در پایگاه NCBI ارزیابی شد. در ابتدا ۳ میلی‌لیتر نمونه خون وریدی در لوله‌های دارای EDTA از هر فرد گرفته شد و DNA

ژنومی با روش فنل-کلروفوم استخراج شد. سپس غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر (Picodrop, Saffron Walden, UK) اندازه‌گیری شد. پروتکل استاندارد PCR-RFLP برای مطالعه پلی مورفیسم‌ها مورد استفاده قرار گرفت. از ۲۵ میکرولیتر محلول واکنشی PCR حاوی ۲۰۰-۴۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۳۰۰ نانومول بر لیتر از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول بر لیتر از هر dNTP ۱/۵ میلی‌مول بر لیتر $MgCl_2$ و ۱ واحد Taq پلیمرز استفاده شد. پس از آن DNA با دمای ذوب اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن انجام ۳۵ چرخه تکثیر شد. هر چرخه شامل دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، دمای annealing به مدت ۴۰ ثانیه (جدول ۱) و مرحله extension در دمای ۷۲ درجه برای ۴۰ ثانیه و extension نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه بود. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز (۱٪) انجام شد. محصولات تکثیر به صورت شبانه با آنزیم محدودکننده هضم شدند. محصولات هضم آنزیمی با الکتروفورز روی ژل آگاروز جداسازی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات پرایمرها و شرایط و محصولات PCR
برای هر یک از پلی مورفیسم‌های rs11558471 و rs13266634

	rs13266634
Primers	
Annealing	59 °C
PCR Fragment	429 bp
RFLP Fragments	CC 195bp, 234bp CT 195bp, 234bp, 429bp TT 429bp
Restriction Enzyme	<i>MspI</i>
	rs11558471
Primers	F 5' CATTGGCAATAAATCCCTCT 3' R 5' CCCATTGACATAGGATTTC 3'
Annealing	52°C
PCR Fragment	439 bp
RFLP Fragments	GG 229bp, 210bp GA 439bp, 229bp, 210bp AA 439bp
Restriction Enzyme	<i>PstI</i>

۲-۵. آنالیز آماری

توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون لیلیفورس^۱ بررسی شد. آزمون U Mann-Whitney برای

متغیرهای ناپارامتریک و متغیرهای پارامتریک با آزمون t یا ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ارتباط متغیرهای طبقه‌بندی شده با Fisher exact و chi-square مورد آزمون قرار گرفت. ارتباط SNP‌های مورد مطالعه با دیابت نوع ۲ با رگرسیون لجستیک ارزیابی شد. انحراف از پیش‌بینی تعادل هاردی واینبرگ^۱ با استفاده از آزمون chi-square تحلیل شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ و R نسخه ۳/۰/۱ انجام شد. سطح معنی‌داری آماری مورد قبول $p > 0/05$ در نظر گرفته شد.

۳. یافته‌ها

۳-۱. مقادیر قند خون، انسولین و HOMA-IR

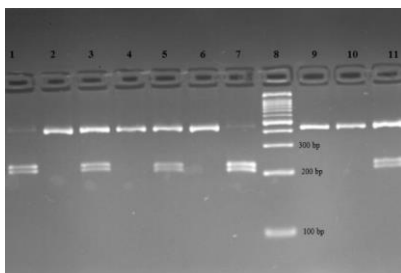
مقادیر پارامترهای مورد مطالعه در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و کنترل‌ها مقایسه شد (جدول ۲). گلوکز ناشتا، HOMA-IR و انسولین به طور معنی‌داری در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت به کنترل بالاتر بود.

جدول ۲- مقایسه مقادیر پارامترهای مورد مطالعه در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و کنترل‌ها

متغیر	بیماران (n=133=T2D)	کنترل (n=128)	p value
مؤنث (%)	69.2	61.4	0.189
سن (سال)	51.84 ± 6.27	46.29 ± 7.39	<0.001
فشار خون دیاستولی (mmHg)	70.68 ± 10.21	70.48 ± 10.38	0.311
فشار خون سیستولی (mmHg)	120.76 ± 20.19	110.73 ± 10.94	<0.001
مصرف دخانیات	8.6	6	0.423
HbA1c (%)	8.04 ± 1.61	5.33 ± 0.28	<0.001
قند خون ناشتا (mmol/L)	9.45 ± 3.74	4.76 ± 0.41	<0.001
انسولین (μU/mL)	12.39	10.41	0.057
HOMA-IR	5.14 ± 4.28	2.22 ± 1.74	<0.001
HDL-C (mmol/L)	1.17 ± 0.3	1.23 ± 0.28	0.143
LDL-C (mmol/L)	2.56 ± 0.82	2.83 ± 0.77	0.01
کلسترول تام (mmol/L)	4.87 ± 1.25	4.98 ± 1.07	0.362
تری‌گلیسرید (mmol/L)	2.22 ± 1.31	1.76 ± 0.86	0.004

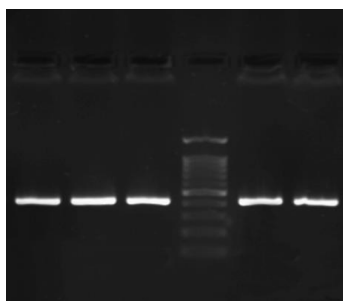
۲-۳. نتایج PCR-RFLP

برای پلی مورفیسم rs11558471، محصولات تکثیر PCR (۴۳۹ جفت باز) تحت تاثیر آنزیم محدودالایر قرار گرفتند که منجر به ایجاد قطعات ۴۳۹، ۲۲۹ و ۲۱۰ جفت بازی در مورد ژنوتیپ‌های GA و ۲۲۹ و ۲۱۰ جفت بازی برای ژنوتیپ‌های GG گردید. ژنوتیپ‌های AA منطبق بر یک قطعه هضم نشده ۴۳۹ جفت بازی بودند (شکل ۱)

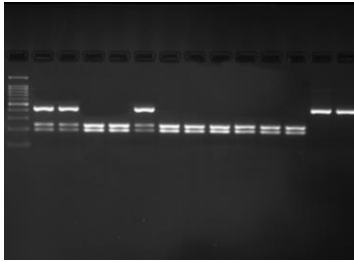


شکل ۱- نتایج PCR-RFLP برای پلی مورفیسم rs11558471. ژنوتیپ‌های GG در حضور قطعات ۲۲۹ و ۲۱۰ جفت بازی (مسیر ۱ و ۷) شناسایی شدند. وجود سه قطعه ۴۳۹، ۲۲۹ و ۲۱۰ جفت بازی (مسیرهای ۳، ۵ و ۱۱) مطابق با ژنوتیپ‌های GA شناسایی شدند و حضور یک قطعه هضم نشده (مسیرهای ۲، ۴، ۶، ۹ و ۱۰) برای ژنوتیپ‌های AA به دست آمد. مسیر ۸ مربوط به DNA-ladder (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز) می‌باشد.

نتایج PCR برای پلی مورفیسم rs13266634 در شکل (۲) نشان داده شده است. طول قطعه محصول PCR در این مطالعه ۴۲۹ bp است. اگر محصولات PCR توسط آنزیم بریده شود و دو قطعه (۱۹۵ bp و ۲۳۴ bp) بدست آید، ژنوتیپ CC خواهد بود. عدم هضم آنزیمی و ایجاد یک قطعه نشان‌دهنده ژنوتیپ TT خواهد بود. هتروزیگوت‌های CT هم سه قطعه ایجاد خواهند کرد (شکل ۳).



شکل ۲- الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ محصول PCR پلی مورفیسم rs13266634. مسیر ۴ از سمت چپ مربوط به DNA-ladder (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز) می‌باشد.



شکل ۳- هضم آنزیمی محصولات PCR پلی مورفیسم rs13266634 با آنزیم MSP روی ژل آگارز ۳٪. مسیره‌های ۲، ۳ و ۶ (سه قطعه): ژنوتیپ CT. مسیره‌های ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۹، ۸، ۵، ۴ (دو قطعه): ژنوتیپ CC، مسیره ۱۳، ۱۴ (یک قطعه): ژنوتیپ TT. مسیره ۱: DNA لدر (شماره‌گذاری مسیره‌ها از سمت چپ است)

۳-۳. توزیع ژنوتیپی و فراوانی الی پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه

توزیع ژنوتیپی و فراوانی الی پلی مورفیسم rs11558471 در جدول (۳) نشان داده شده است. این ژنوتیپ‌ها در دو جمعیت بیمار و کنترل در تعادل هاردی- واینبرگ بودند. توزیع ژنوتیپی و فراوانی الی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان نداد. به هر حال، فراوانی ژنوتیپ‌های AA و فراوانی الی ریسکی A در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت به کنترل‌ها بیشتر بود ($OR=1.44$, 95% CI 0.47-4.65, $p=0.584$) در برابر GG؛ $OR=1.15$, 95% CI 0.75-1.76, $p=0.521$ در برابر الی A، اگرچه مقادیر از نظر آماری معنی‌دار نبودند.

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم rs11558471 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و کنترل‌ها و ارتباط آنها با احتمال ابتلا به دیابت نوع ۲

Genotype/allele	Control (n=128)	Case (n=133)	OR	Lower of 95% CI	Upper of 95% CI	P value
GG	8 (6.25)	6 (4.51)	1	-	-	-
GA	41 (32.03)	41 (30.83)	1.322	0.415	4.439	0.7742
AA	79 (61.72)	86 (64.66)	1.44	0.471	4.651	0.584
G	57 (0.223)	53 (0.199)	1	-	-	-
A	199 (0.777)	213 (0.801)	1.151	0.754	1.757	0.5215

توزیع ژنوتیپی و فراوانی الی پلی مورفیسم rs13266634 در جدول (۴) نشان داده شده است. این ژنوتیپ‌ها در دو جمعیت بیمار و کنترل در تعادل هاردی- واینبرگ بودند. توزیع ژنوتیپی و فراوانی الی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان نداد. به هر حال، فراوانی ژنوتیپ‌های CC و فراوانی الی ریسکی C در بیماران مبتلا به دیابت

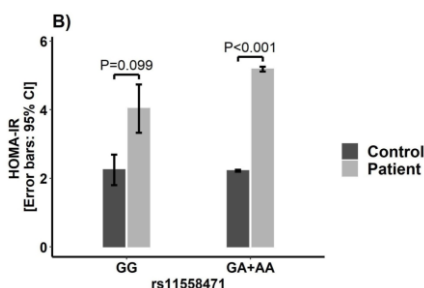
نوع ۲ نسبت به کنترل‌ها بیشتر بود (OR=1.88, 95% CI 0.72-5.32, p=0.236) برای CC در برابر TT؛ OR=1.11, 95% CI 0.75-1.67, p=0.610 برای ال C در برابر ال T)، اگرچه مقادیر از نظر آماری معنی‌دار نبودند.

جدول ۴- فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم rs13266634 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و کنترل‌ها و ارتباط آنها با احتمال ابتلا به دیابت نوع ۲

Genotype/allele	Control (n=128)	Case (n=133)	OR	Lower of 95% CI	Upper of 95% CI	P value
TT	13 (10.16)	7 (5.26)	1	-	-	-
TC	39 (30.47)	48 (36.09)	2.249	0.827	6.606	0.137
CC	76 (59.38)	78 (58.65)	1.881	0.722	5.328	0.236
T	65 (25.39)	62 (23.31)	1	-	-	-
C	191 (74.61)	204 (76.69)	1.119	0.75	1.673	0.610

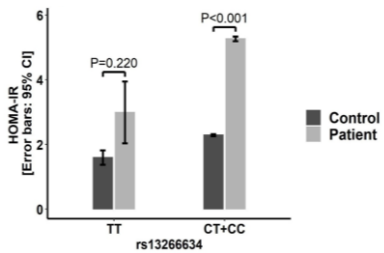
۳-۴. مقایسه تغییرات در HOMA-IR و قند خون ناشتا براساس ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه

چنانکه در نمودار (۱) مشاهده می‌شود، برای پلی مورفیسم rs11558471، مقادیر HOMA-IR در گروه GA + AA و ژنوتیپ‌های GG، در بیماران بالاتر از گروه کنترل بود. به هر حال تفاوت‌ها فقط در گروه GA + AA از نظر آماری معنی‌دار بودند (p<0.001).



نمودار ۱- مقایسه تغییرات در مقادیر HOMA-IR براساس ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مورفیسم rs11558471 در بیماران و گروه کنترل

همچنین چنانکه در نمودار (۲) مشاهده می‌شود، برای پلی مورفیسم rs13266634 مقادیر HOMA-IR در گروه CC + CT و ژنوتیپ‌های TT، در بیماران بالاتر از گروه کنترل بود. به هر حال تفاوت‌ها فقط در گروه CC + CT از نظر آماری معنی‌دار بودند (p<0.001).



نمودار ۲- مقایسه تغییرات در مقادیر HOMA-IR براساس ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs13266634 در بیماران و گروه کنترل

به علاوه، برای هر دو پلی مورفیسم مورد مطالعه، مقادیر قند خون ناشتا در همه گروه‌های ژنوتیپی در بیماران به طور معنی دار از گروه کنترل بالاتر بود. به هر حال تفاوت‌ها فقط در گروه‌های CT + CC (برای پلی مورفیسم rs13266634) و GA + AA (برای پلی مورفیسم rs11558471) از نظر آماری معنی دار بودند ($p < 0.001$).

۴. بحث

اخیراً مطالعات گسترده‌ای در راستای بررسی اثر پلی مورفیسم‌های مختلف بر روی عوامل گوناگون مرتبط با بیماری دیابت صورت گرفته است. در تحقیق حاضر مشخص گردید پلی مورفیسم‌های rs11558471 و rs13266634 با علائم گلاسمی در جمعیت مورد مطالعه ایرانی - که براساس گزارش‌های قبلی شیوع دیابت نوع ۲ در آن یکی از بالاترین مقادیر در بین کشورهای در حال توسعه است - در ارتباط هستند (۱۹). اهمیت بررسی پلی مورفیسم rs11558471 در این تحقیق زمانی آشکارتر می‌شود که این پلی مورفیسم در ژن ترانسپورتر روی ۸ (ZnT) ارتباطی قوی با پلی مورفیسم rs13266634 دارد که براساس مطالعات genome wide association یکی از مارکرهای ژنتیکی تایید شده برای دیابت نوع ۲ می‌باشد (۲۰، ۲۱). همچنین مطابق با یافته‌های Cheng و همکاران، پلی مورفیسم rs13266634 در ۸SLC30A می‌تواند یک فاکتور ژنتیکی مهم ابتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیت‌های آسیایی و اروپایی (و نه آفریقایی) باشد (۲۲).

در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ فراوانی آلل ریسکی (آلل A) در مقایسه با نمونه‌های کنترل افزایش می‌یابد. یافته‌های تحقیق حاضر با مطالعات Ree و همکاران در مطالعه بر روی جمعیت آسیایی و مطالعات ژنتیکی دیابت در پاکستان هماهنگ بود (۲۳). فراوانی آلل A در بیماران دیابت نوع ۲، ۰/۸۰۱ به دست آمد که این مقدار در مطالعات Fesinmeyer و همکاران در یک جمعیت آمریکایی آفریقایی تبار ۰/۹۱ و در یک جمعیت آمریکایی اروپایی الاصل ۰/۶۸ گزارش شده بود (۲۴).

پلی مورفیسم‌های عملکردی مهم در ترانسپورتر روی ۸ (AZnT) (مانند ۱۱۵۵۸۴۷۱rs و ۱۳۲۶۶۶۳۴rs) می‌توانند در استعداد ژنتیکی برای اختلال در عملکرد سلول‌های بتا دخیل باشند (۲۵). آنالیزها براساس ژنوتیپ‌های ۱۱۵۵۸۴۷۱rs و ۱۳۲۶۶۶۳۴rs نشان داد که در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ هم گلوکز ناشتا و هم HOMA-IR با ترتیب GG<GA<AA و TT<CT<CC افزایش می‌یابد. آنالیزهای مربوط به این پلی مورفیسم با گلوکز ناشتا نشان داد که این پلی مورفیسم می‌تواند در گلوکز ناشتای این جمعیت ایرانی موثر باشد. این یافته با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد. از جمله Kim و همکاران قبلاً نشان دادند که در یک جمعیت مورد مطالعه در کشور کره، پلی مورفیسم مذکور با تغییرات و ایجاد اختلال در میزان گلوکز ناشتا همراه است (۲۶). براساس تحقیق حاضر، علاوه بر گلوکز ناشتا، پلی مورفیسم‌های ۱۱۵۵۸۴۷۱rs و ۱۳۲۶۶۶۳۴rs می‌تواند بر مقاومت به انسولین براساس HOMA-IR تاثیر داشته باشد. تفاوت‌های نژادی می‌توانند بر اثر پلی مورفیسم روی مشخصات مختلف قند خون تاثیر داشته باشند. Fesinmeyer و همکاران در پژوهشی نشان دادند که پلی مورفیسم ۱۱۵۵۸۴۷۱rs به طور معنی‌داری بر سطح گلوکز ناشتا در جمعیت آمریکایی‌های اروپایی تبار موثر است؛ در حالی که بر جمعیت آمریکایی‌های آفریقایی تبار تاثیر معنی‌داری ندارد (۲۴). مطالعه Strawbridge نیز نشان داد که این پلی مورفیسم به طور معنی‌داری با گلوکز ناشتا مرتبط است، ولی بر HOMA-IR در بالغین غیردیابتی با اجداد اروپایی تاثیر ندارد. مطالعه جالب توجه دیگر توسط Yang و همکاران نشان داد فراوانی‌های SNP‌های مرتبط با ویژگی‌های مختلف قند خون، به طور معنی‌داری براساس ویژگی‌های قومی و نژادی تغییر می‌کند (۲۷، ۲۸). گزارش‌های متعددی وجود دارد که بر پایه آنها پلی مورفیسم در ۱۳۲۶۶۶۳۴rs با دیابت نوع ۲ مرتبط است (۲۹، ۳۰).

۵. نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که یک ارتباط ژنتیکی میان پلی مورفیسم‌های ۱۱۵۵۸۴۷۱rs و ۱۳۲۶۶۶۳۴rs به عنوان دو SNP مهم در ژن ترانسپورتر روی شماره ۸ با مشخصه‌های مربوط به قند خون در جمعیت ایرانی مورد مطالعه وجود دارد و می‌تواند بر اختلال در عملکرد سلول‌های بتا موثر باشد. ارتباط پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه با مقاومت به انسولین و گلوکز ناشتا نشان داد که این پلی مورفیسم‌ها ممکن است برای شناسایی افرادی که ریسک بالایی برای ابتلا به بیماری دیابت نوع ۲ دارند، مفید باشد. البته مطالعات تکمیلی بیشتری برای درک بهتر نقش پلی مورفیسم‌های یاد شده با مشخصه‌های مختلف مربوط به قند خون، به ویژه در جمعیت‌های دارای ریسک بالا برای ابتلا به دیابت نوع ۲ لازم است.

References

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U & Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 103(2): 137–149. **DOI:** 10.1016/j.diabres.2013.11.002
2. Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD & Unakalamba CB. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol.* 2013; 4: 46–57. **DOI:** 10.5897/JPAP2013.0001
3. Thompson A & Kanamarlapudi V. Type 2 Diabetes mellitus and glucagon like peptide-1 receptor signalling. *Clin Exp Pharmacol.* 2013; 1: 3.
4. Maahs DM, West NA, Lawrence JM & Mayer-Davis EJ. Chapter 1: epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010; 39(3): 481–497. **DOI:** 10.1016/j.ecl.2010.05.011
5. Kahn SE, Cooper ME & Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014; 383(9922): 1068–1083. **DOI:** 10.1016/S0140-6736(13)62154-6
6. Leahy JL. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Res.* 2005; 36(3): 197–209. **DOI:** 10.1016/j.arcmed.2005.01.003
7. Chen L, Magliano DJ & Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus[mdash]present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8(4): 228–236. **DOI:** 10.1038/nrendo.2011.183
8. Raz I. Guideline approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013; 36(Suppl 2): S139–S144. **DOI:** 10.2337/dcS13-2035
9. Ali, O. Genetics of type 2 diabetes. *World J. Diabetes.* 2013; 4: 114–123.
10. Flannick J, Thorleifsson G, Beer NL, Jacobs SB, Grarup N, Burt NP & et al. Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2014; 46: 357.
11. Lin Z, Wang Y, Zhang B & Jin Z. Association of type 2 diabetes susceptible genes GCKR, SLC30A8, and FTO polymorphisms with gestational diabetes mellitus risk: a meta-analysis. *Endocrine.* 2018; 62: 34-45.
12. Szabo M, Máté B, Csépi K & Benedek T. Genetic approaches to the study of gene variants and their impact on the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem Genet.* 2018; 56: 22-55.
13. Carvalho S, Molina-López J, Parsons D, Corpe C, Maret W & Hogstrand C. Differential cytolocation and functional assays of the two major human SLC30A8 (ZnT8) isoforms. *J Trace Elem Med Biol.* 2017; 44: 116-24.
14. Sun H, Li C, Li S, Li X, Wang J, Zhou Z & et al. Gene silencing of ZnT8 attenuates inflammation and protects pancreatic tissue injury in T1D. *Immunol Lett.* 2018; 198: 1-6.
15. Kanoni S, Nettleton JA, Hivert M-F, Ye Z, Van Rooij FJ, Shungin D & et al. Total zinc intake may modify the glucose-raising effect of a zinc transporter (SLC30A8) variant: a 14-cohortmeta-analysis. *Diabetes.* 2011; 60: 2407-16.

16. Arvan P, Pietropaolo M, Ostrov D & Rhodes CJ. Islet autoantigens: structure, function, localization, and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2: a007658.
17. Hardy A, Wijesekara N, Genkin I, Prentice KJ, Bhattacharjee A, Kong D & et al. Effects of highfat diet feeding on Znt8-null mice: differences between β -cell and global knockout of Znt8. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302: E1084-E96.
18. Salem SD, Riyadh SA, Ikram SI, Zaid AH & Sekaran M. Contribution of SLC30A8 variants to the risk of type 2 diabetes in a multi-ethnic population: a case control study. *BMC Endocr Disord.* 2014; 14(2): 1472-6823.
19. Mahrooz A, Hashemi-Soteh MB, Heydari M, Boorank R, Ramazani F, Mahmoudi A & et al. Paraoxonase 1 (PON1)-L55M among common variants in the coding region of the paraoxonase gene family may contribute to the glycemic control in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta.* 2018; 484: 40-6.
20. Saki F & Karamizadeh Z. Metabolic syndrome, insulin resistance and Fatty liver in obese Iranian children. *Iran Red Crescent Med J.* 2014; 16: e6656.
21. Rees SD, Hydrie MZI, O'Hare JP, Kumar S, Shera AS, Basit A & et al. Effects of 16 genetic variants on fasting glucose and type 2 diabetes in South Asians: ADCY5 and GLIS3 variants may predispose to type 2 diabetes. *PloS one.* 2011; 6: e24710.
22. Cheng, L & et al. Association between SLC30A8 rs13266634 polymorphism and type 2 diabetes risk: a meta-analysis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* 21(2015): 2178.
23. Rees SD, Hydrie MZI, O'Hare JP, Kumar S, Shera AS, Basit A & et al. Effects of 16 genetic variants on fasting glucose and type 2 diabetes in South Asians: ADCY5 and GLIS3 variants may predispose to type 2 diabetes. *PloS one.* 2011; 6: e24710.
24. Fesinmeyer MD, Meigs JB, North KE, Schumacher FR, Bůžková P, Franceschini N & et al. Genetic variants associated with fasting glucose and insulin concentrations in an ethnically diverse population: results from the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) study. *BMC Med Genet.* 2013; 14: 98.
25. Ramos E, Chen G, Shriner D, Doumatey A, Gerry N, Herbert A & et al. Replication of genomewide association studies (GWAS) loci for fasting plasma glucose in African-Americans. *Diabetologia.* 2011; 54: 783-8.
26. Kim M, Kim M, Huang L, Jee SH & Lee JH. Genetic risk score of common genetic variants for impaired fasting glucose and newly diagnosed type 2 diabetes influences oxidative stress. *Sci Rep.* 2018; 8: 7828.
27. Yang Q, Liu T, Shrader P, Yesupriya A, Chang M-h, Dowling NF & et al. Racial/Ethnic Differences in Association of Fasting Glucose-Associated Genomic Loci with Fasting Glucose, HOMA-B, and Impaired Fasting Glucose in the US Adult Population. *Diabetes Care.* 2010; 33: 2370-2377.
28. Strawbridge RJ, Dupuis J, Prokopenko I, Barker A, Ahlqvist E, Rybin D & et al. Genome-wide association identifies nine common variants associated with fasting proinsulin levels and provides new insights into the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2011; 60: 2624-34.

29. Weijers RNM. Three-dimensional structure of b-cellspecific zinc transporter, ZnT8, predicted from the type 2 diabetes: associated gene variant SLC30A8 R325W. *Diabetol Metab Syndr.* 2010; 2: 33–40.
30. Xu K, Zha M, Wu X, Yu Z, Yu R & et al. Association between rs13266634 C/T polymorphisms of solute carrier family 30 member 8 (SLC30A8) and type 2 diabetes, impaired glucose tolerance, type 1 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 91: 195-202.