

بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های *CAPN10* rs3792267 (G/A) و *TCF7L2* rs11196205 (C/G) با دیابت نوع دو در جمعیت قوم عرب استان خوزستان

عبداله گراوند^۱، علی محمد فروغمنند^{۲*}، مهدی پورمهدی بروجنی^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۰۷/۰۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: دیابت نوع دو یک بیماری چندعاملی و هتروژنیک است که با نقص در تولید یا عملکرد انسولین مشخص می‌شود. اخیراً از طریق مطالعات گسترده ارتباط ژنومی (GWAS)، همراهی چندین ژن با بیماری دیابت نوع دو نشان داده شده است. هدف از این مطالعه بررسی همراهی پلی مورفیسم‌های rs11196205 از ژن *TCF7L2* و rs3792267 از ژن *CAPN10* با دیابت نوع دو در جمعیت قوم عرب استان خوزستان بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد - شاهدی، ۹۸ بیمار دیابتی و ۹۶ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. تعیین ژنوتیپ این افراد برای rs11196205 با استفاده از فن TETRA ARMS PCR و برای rs3792267 با استفاده از فن PCR-RFLP انجام شد.

یافته‌ها: برای پلی مورفیسم rs11196205 *TCF7L2*، توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CG، GG در گروه بیماران دیابتی، به ترتیب (۳۴/۶۹ درصد)، (۳۴/۰۴)، (۵۲/۰۴) درصد، ۵۱ (۱۳/۲۶ درصد) و در گروه کنترل به ترتیب (۱۹/۷۹ درصد)، (۶۰/۴۱ درصد)، (۵۸ درصد) بود و مقایسه فراوانی دو آلل C و G بین افراد دیابتی و گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P\text{-value}=0/04$). برای پلی مورفیسم rs3792267 *CAPN10* نیز، توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA، AA در بیماران دیابتی به ترتیب (۶۶/۶۷/۳)، (۳۲/۳۲/۷)، (۰/۰) و در گروه کنترل به ترتیب (۶۲/۶۴/۶)، (۳۱/۳۲/۳)، (۳/۳/۱) بود. نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه فراوانی دو آلل G و A نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین افراد بیمار و کنترل وجود ندارد ($P=0/53$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که آلل C در پلی مورفیسم rs11196205 *TCF7L2*، خطر ابتلا به دیابت نوع دو را در جمعیت قوم عرب استان خوزستان افزایش می‌دهد. پلی مورفیسم rs3792267 *CAPN10* همراهی معنی‌داری با بیماری دیابت نوع دو در جمعیت مورد مطالعه نشان نداد.

کلیدواژه‌ها: دیابت نوع دو، ژن *CAPN10*، rs11196205، rs3792267، ژن *TCF7L2*

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره هشتم، ص ۶۱۳-۶۰۳، آبان ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: اهواز، بلوار گلستان، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه ژنتیک تلفن: ۰۹۱۶۳۶۳۹۲۲۴

Email: foroughmand.a@scu.ac.ir

مقدمه

چندعاملی می‌باشد و چندین عامل ژنتیکی و محیطی مختلف توأمان، استعداد ابتلا به این بیماری را تعیین می‌کنند (۵). در بیشتر موارد ابتلا به دیابت نوع دو تحت تأثیر بسیاری از ژن‌ها است و هر یک از آن‌ها یک فاکتور کوچک در افزایش احتمال ابتلا به دیابت نوع دو می‌باشد (۲). با توجه به تغییر الگوی بیماری‌ها از بیماری‌های عفونی به بیماری‌های مزمن و چندعاملی که تحت تأثیر ژن‌های متعدد با میزان اثر متفاوت هستند می‌توان دیابت را به‌عنوان یک مشکل بزرگ و به‌سرعت گسترش‌یابنده برای سلامت عمومی جهان معرفی کرد (۶). نه‌تنها هیچ نشانه‌ای از کاهش میزان شیوع دیابت

دیابت نوع دو (T2DM)، یک بیماری هتروژن است که به‌صورت هیپرگلیسمی، نمود پیدا می‌کند و معمولاً با ناتوانی سلول‌های بتای پانکراس در افزایش ترشح انسولین برای جبران مقاومت به انسولین در بافت‌های محیطی هدف مانند ماهیچه و کبد و سلول‌های چربی مشخص می‌شود (۱ و ۲). دیابت نوع دو بیش از ۹۰ درصد کل موارد دیابت را شامل می‌شود (۳). بیماران دیابتی هرچند از نظر ویژگی هیپرگلیسمی به هم شبیه هستند اما از نظر بالینی و آسیب‌شناسی و ژنتیکی ناهمگون هستند (۴). دیابت نوع دو، یک اختلال متابولیکی

^۱ کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

^۲ دانشیار ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار اپیدمیولوژی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

(۱۵،۱۶). با توجه به اینکه تاکنون گزارشی از مطالعه همراهی ژن TCF7L2 و ژن CAPN10 با دیابت نوع دو در جمعیت عرب استان خوزستان مشاهده نشده است؛ در این پژوهش بر آن شدیم که همراهی پلی مورفیسم‌های rs11196205 TCF7L2 و rs3792267 CAPN10 را با بیماری دیابت نوع دو در جمعیت قوم عرب استان خوزستان مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

اطلاعات بیماران:

در این پژوهش که به صورت مورد - شاهدی انجام شد؛ به دلیل محدودیت زمانی و عدم دسترسی به بیماران بیشتر، ۱۰۰ فرد دیابتی و ۱۰۰ فرد سالم برای مطالعه انتخاب شدند که به دلیل از دست رفتن اطلاعات دو نفر از افراد دیابتی و چهار نفر از گروه کنترل، تحلیل آماری بر اساس ۹۸ فرد دیابتی و ۹۶ فرد سالم انجام گرفت. بیماران از میان افراد مراجعه‌کننده به کلینیک فوق تخصصی دیابت و بیمارستان گلستان اهواز انتخاب شدند. این گزینش با نظر متخصصین امر در این بخش صورت گرفت. تشخیص افراد مبتلا به دیابت نوع دو بر اساس معیارهای ADA (انجمن دیابت آمریکا) صورت گرفت. افراد مبتلا به دیابت به عنوان نمونه‌هایی انتخاب شدند که از داروها برای درمان دیابت استفاده می‌کردند. در ضمن پرسش‌نامه‌هایی تهیه و طراحی شد که در این پرسش‌نامه‌ها سؤال‌هایی در مورد سن، قد، وزن، قومیت، سابقه‌ی ابتلا در خویشاوندان درجه یک، میزان قند خون ناشتا، میزان تری گلیسیرید و کلسترول آورده شده است. افراد کنترل از میان افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان گلستان اهواز و بیمارستان ولیعصر خرمشهر انتخاب شدند. سن همه افراد گروه کنترل بالاتر از ۴۹ سال بود و هیچ‌گونه سابقه ابتلا به دیابت نوع دو در خود و خویشاوندان درجه یک نداشتند. برای افراد کنترل نیز پرسشنامه‌هایی مشابه گروه بیمار تهیه شد. ضمناً تمامی افراد هر دو گروه بیمار و کنترل، ساکن استان خوزستان بودند و هیچ‌گونه وابستگی قومی به گروه‌های غیر عرب نداشتند. این پروژه توسط کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز تأیید شده است. قبل از نمونه‌گیری، همه افراد دو گروه بیمار و کنترل، فرم رضایت‌نامه را برای شرکت در این مطالعه امضا کردند.

استخراج DNA:

از افراد بیمار و کنترل حدود ۵ میلی لیتر خون محیطی در لوله‌های فالتون حاوی EDTA ۰/۵ مولار (چپت لخته نشدن خون) جمع‌آوری شد. استخراج DNA به صورت دستی و با روش salting out انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده

نوع دو وجود ندارد؛ بلکه شیوع آن در حال افزایش است و انتظار می‌رود تحت تأثیر عواملی مانند افزایش پیری جمعیت، تغییر سبک زندگی و عادات رژیم غذایی مردم، دیابت نوع دو همچنان یکی از علل اصلی بیماری‌زایی و مرگ‌ومیر باقی بماند (۷ و ۸). پیش‌بینی می‌شود که تعداد افراد مبتلا به دیابت در محدود سنی ۲۰ تا ۷۹ سالگی تا سال ۲۰۴۰ میلادی به ۶۴۲ میلیون نفر در سراسر جهان برسد (۹). محدوده شیوع دیابت نوع دو در آسیا از ۱/۲ درصد تا ۱۴/۶ درصد و در ایران از ۱/۳ درصد (در مناطق روستایی) تا ۱۴/۵ درصد (در شهرهای بزرگ) متغیر بوده است. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، میزان شیوع دیابت در سال ۲۰۱۱ در جمعیت بالغین ایران برابر با ۱۰/۳ درصد بود که در مردان ۱۰ درصد و در زنان ۱۰/۴ درصد اعلام شد (۱۰ و ۱۱).

به‌وسیله مطالعات گسترده ژنوم (GWAS) و مطالعات ژن‌های کاندید، تاکنون همراهی بیش از ۴۰ لوکوس از جمله ژن‌های TCF7L2، CAPN10، FTO، KCNJ11، CDKAL و IRS1 با دیابت نوع دو نشان داده شده است (OMIM, 2013). در میان ژن‌های مستعد کننده به دیابت نوع دو، ژن TCF7L2 بزرگ‌ترین اثر را دارد و واریانت‌های این ژن به‌عنوان قوی‌ترین عوامل خطر ژنتیکی شناخته شده برای دیابت نوع دو مطرح هستند (۲). ژن TCF7L2 که TCF4 نیز نامیده می‌شود یک عضو از خانواده TCF و جزء کلیدی از مسیر سیگنال دهی Wnt است. TCF7L2 که دارای ۱۷ اگزون است، نقش مهمی در هموستاز گلوکز و عملکرد سلول‌های بتا دارد و در محدوده‌ای به طول ۲۱۵، ۸۳۶ جفت باز روی کروموزوم 10q25.3 قرار دارد. تغییر نوکلئوتید C به G در ناحیه ژنی ۱۱۴، ۷۸۵، ۰۳۷ بر روی اینترون چهارم به نام rs11196205 (C/G) است (۱۲). ژن CAPN10 اولین ژن مستعد کننده به بیماری دیابت نوع دو بود که از طریق غربالگری وسیع ژنوم و مطالعات پیوستگی ژنی در جمعیت لاتین و اسپانیایی ایالت تکراس شناسایی شد (۱۳ و ۱۴). Calpains یک خانواده حفاظت‌شده از سیستمین پروتئازهای داخل سلولی وابسته به کلسیم هستند. ژن CAPN10 در منطقه NIDDM1 واقع شده است و به‌وسیله پیرایش متناوب به‌صورت رونوشت‌های مختلف mRNA در چندین نوع بافت، به‌ویژه آن‌ها که در تنظیم هموستاز گلوکز نقش دارند مانند سلول‌های پانکراس β ، کبد، عضله اسکلتی و سلول‌های چربی بیان می‌شود. این ژن هرچند بیان بالایی در قلب و مغز و کبد و کلیه و پانکراس و بافت چربی دارد اما مهم‌ترین نقش آن در بافت‌هایی نظیر عضله اسکلتی است. ژن CAPN10 که بر روی ناحیه کروموزومی q37.32 واقع شده است ۱۵ اگزون دارد. محدوده‌ی آن ۳۱Kb، با احتمالاً دوازده SNP واقع در مناطق مختلف اینترونی است. rs3792267 (G/A) در اینترون سوم واقع شده است

از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. تعیین ژنوتیپ افراد برای rs11196205 (C/G) از طریق فن TETRA ARMS PCR انجام گرفت. طراحی پرایمرهای اختصاصی این پلی مورفیسم به وسیله نرم افزار 7 Oligo صورت گرفت (جدول شماره ۱).

TCF7L2 rs11196205**جدول (۱):** مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای پلی مورفیسم rs11196205

نوع پرایمر	توالی پرایمر ۳' → ۵'	GC%	Tm
Forward-inner	CTGAAAGTTCTCAACATTTATAACTGCC	35.71	64.3
Reverse-inner	CAACCATAACTCTCTTACATACTGGTC	40.74	65.3
Forward-outer	TAGATTGCTCCTTTTGTCTCTGCTAC	37.04	63.7
Reverse-outer	TAAACATCTGACCTTGAAGCCTACC	44.0	64.2

Master Mix PCR از شرکت Amplikon تهیه شد. با استفاده از ترموسایکلر Bio-Rad هر PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد (جدول شماره ۲).

جدول (۲): برنامه حرارتی و زمانی PCR پلی مورفیسم rs11196205

مرحله	تعداد تکرار	بخش	دما (C°)	مدت زمان
اول	۱ سیکل	واسرشت اولیه	۹۵	۵ دقیقه
		واسرشت ثانویه	۹۵	۳۰ ثانیه
دوم	۳۰ سیکل	اتصال	۵۸	۳۰ ثانیه
		طویل شدن اولیه	۷۲	۱۵ ثانیه
سوم	۱ سیکل	طویل شدن ثانویه	۷۲	۵ دقیقه

CAPN10 rs379226

تعیین ژنوتیپ برای rs3792267، با استفاده از فن PCR-RFLP انجام شد. بدین منظور قسمتی از ژن CAPN10 که شامل پلی مورفیسم مورد نظر بود به وسیله فن PCR تکثیر شد (جدول شماره ۳).

اندازه قطعات DNA تکثیر شده مربوط به ژن TCF7L2 عبارت بودند از: قطعه کنترل ۴۳۴ bp، آلل C ۲۵۳ bp و آلل G ۲۳۵ bp. محصولات PCR بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شدند. که با توجه به اختلاف اندک بین قطعات ۲۵۳ bp و ۲۳۵ bp، ژل آگارز با غلظت ۳ درصد مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین اندازه قطعات DNA تکثیر شده در ژل، از ۵۰ bp Ladder استفاده شد (تصویر شماره ۱).

جدول (۳): مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای پلی مورفیسم rs3792267(SNP-43)

نوع پرایمر	توالی پرایمر ۳' → ۵'	GC%	Tm	طول محصول
Forward	CACGCTTGCTGGAAGTAATGC	50	62.1	141 bp
Reverse	TGATCCCATGGTCTGTAGCAC	50	62.1	

ناجور در موقعیت نوکلئوتید سوم از سمت ۳' تعبیه شده است. هدف از قرار دادن این باز ناجور، ایجاد جایگاه شناسایی برای آنزیم

پرایمر Forward از منبع [۱۱۶] گرفته شد و پرایمر Reverse به وسیله نرم افزار 7 Oligo طراحی شد. در پرایمر Forward یک باز

قطعات ۱۴۱ bp و ۱۱۸ bp، ژل آگارز با غلظت ۲/۵ درصد مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به الگوی برش این آنزیم، برای افراد هموزیگوت با ژنوتیپ AA، دو قطعه ۱۱۸ bp و ۲۳ bp روی ژل مشاهده شد و هموزیگوت های GG، فقط یک قطعه ۱۴۱ bp را نشان دادند و برای افراد هتروزیگوت، سه قطعه ۲۳ bp، ۱۱۸ bp و ۱۴۱ bp مشاهده شد (تصویر شماره ۳). البته لازم به ذکر است که قطعه ی ۲۳ bp به علت کوچک و سبک بودن به سرعت از ژل خارج می شود و در تصویر نهایی ژل دیده نمی شود.

محدودکننده ی Mph1103I است. برنامه حرارتی و زمانی PCR پلی مورفیسم rs3792267(SNP-43) در جدول شماره ۴ آورده شده است. سپس برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد و برای رنگ آمیزی از DNA safe stain استفاده شد (تصویر شماره ۲). اندازه قطعه تکثیر شده ۱۴۱ bp بود که به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد تحت تأثیر آنزیم Mph1103I قرار گرفت تا هضم آنزیمی صورت گیرد. محصولات حاصل از RFLP نیز بر روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. در این مرحله با توجه به اختلاف اندک بین

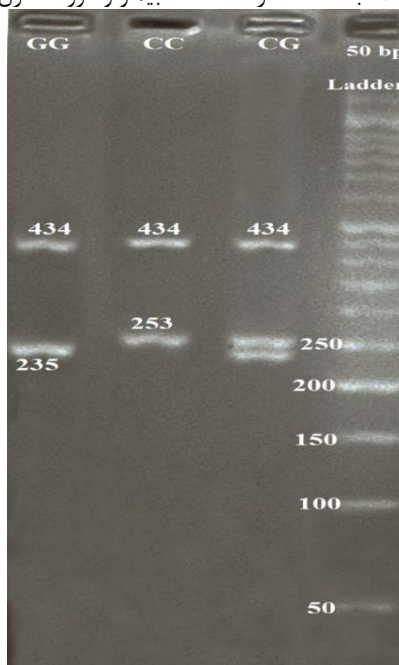
جدول (۴): برنامه حرارتی و زمانی PCR پلی مورفیسم rs3792267(SNP-43)

مرحله	تعداد تکرار	بخش	دما (C°)	مدت زمان
اول	۱ سیکل	واسرشت اولیه	۹۵	۵ دقیقه
دوم	۳۰ سیکل	واسرشت ثانویه	۹۵	۳۰ ثانیه
		اتصال	۵۹	۳۰ ثانیه
		طویل شدن اولیه	۷۲	۱۵ ثانیه
سوم	۱ سیکل	طویل شدن ثانویه	۷۲	۵ دقیقه

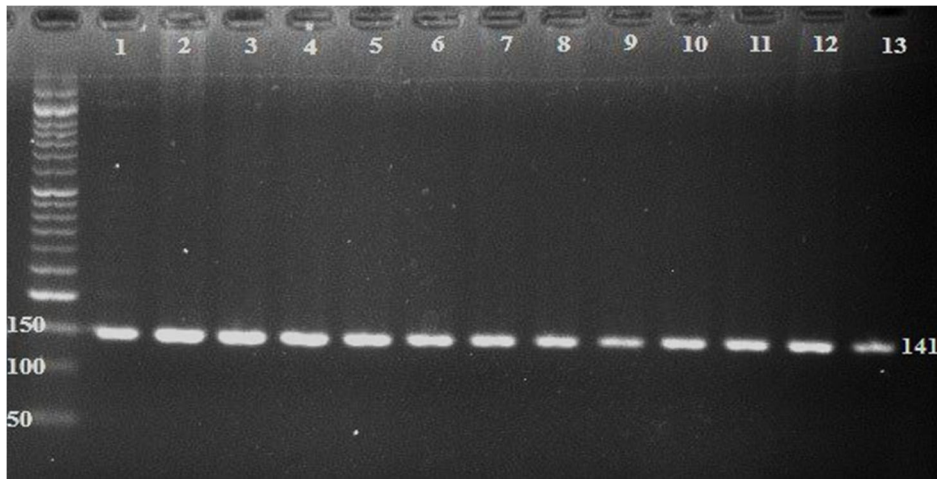
آنالیز داده ها:

برنامه SPSS version 16 و با بکار گیری روش های آماری کای-اسکوئر و رگرسیون لجستیک با در نظر گرفتن مقدار $P < 0.05$ و محاسبه نسبت OR با فاصله اطمینان (CI) ۹۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای مقایسه پارامترهای بیوشیمیایی و بالینی بین گروه بیمار و گروه کنترل از آزمون Mann-Whitney استفاده شد.

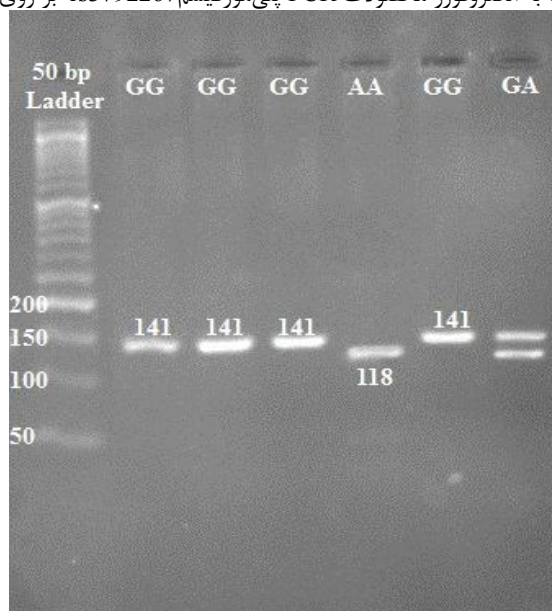
جهت تأیید نتایج حاصل از تکنیک های بکار برده شده (TETRA ARMS PCR و PCR-RFLP) برای هر کدام از پلی مورفیسم ها، تعدادی از نمونه ها تعیین توالی شد. تعیین توالی، نتایج حاصله را تأیید کرد. سپس نتایج به دست آمده با استفاده از



تصویر (۱): نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات TETRA ARMS PCR پلی مورفیسم rs1196205 بر روی ژل آگارز ۳ درصد



تصویر (۲): نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات PCR پلی مورفیسم rs3792267 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد



تصویر (۳): نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات RFLP پلی مورفیسم rs3792267 بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد

یافته‌ها

در این پژوهش تعداد ۱۹۴ نفر، شامل ۹۸ بیمار دیابتی (۵۲ مرد و ۴۶ زن؛ با میانگین سنی $52 \pm 8/89$) و ۹۶ فرد سالم (۴۲ مرد و ۵۴ زن؛ با میانگین سنی $56/36 \pm 7/17$) مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول شماره ۵). از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین تعداد افراد گروه بیمار و گروه کنترل وجود نداشت ($p=0/89$) از لحاظ معیارهای دیابت، بین افراد گروه دیابتی و گروه کنترل تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/0001$) و میانگین BMI و تری‌گلیسرید در افراد گروه دیابتی بصورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ($p=0/001$) اما تفاوت آماری معنی‌داری بین کلسترول تام افراد گروه دیابتی و گروه کنترل وجود نداشت ($p=0/88$). ویژگی‌های

بالینی و بیوشیمیایی افراد مورد مطالعه بصورت خلاصه در جدول شماره ۵ آمده است.

برای پلی مورفیسم TCF7L2 rs11196205، در گروه بیماران دیابتی، توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های GG، CG، CC به ترتیب ۳۴/۶۹ درصد، ۳۴ درصد، ۵۲/۰۴ درصد، ۵۱ درصد، ۱۳/۲۶ درصد و ۱۳ درصد کنترل به ترتیب ۱۹/۷۹ درصد، ۱۹ درصد، ۶۰/۴۱ درصد، ۵۸ درصد، ۱۹/۷۹ درصد بود (جدول شماره ۶).

تحلیل آماری با روش کای-اسکوئر نشان داد که در زنان، بین ژنوتیپ افراد بیمار و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p=0/003$). $X^2=11/64$ df=۲ $P=0/003$. اما در مردان، بین ژنوتیپ افراد بیمار و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P=0/09$). $X^2=4/72$ df=۲ $P=0/09$. در یک مقایسه کلی بین فراوانی ژنوتیپی دو گروه بیمار و کنترل،

گرفت و نشان داده شد که ارتباط معنی داری میان ژنوتیپ های GG و CC و CG با این پارامترها وجود ندارد.

برای پلی مورفیسم rs3792267 CAPN10، توزیع فراوانی ژنوتیپ های GG، GA، AA به ترتیب (۳۱/۳)، (۳۲/۷)، (۳۲/۰) در بیماران دیابتی و (۶۴/۶)، (۳۲/۳)، (۳/۱) در گروه کنترل بود (جدول شماره ۸). تحلیل آماری با روش کای-اسکوئر نشان داد که در زنان، بین ژنوتیپ افراد بیمار و کنترل اختلاف معنی داری وجود ندارد ($X^2=2/64$ df=2 p -value=0/27). همچنین در مردان نیز، بین ژنوتیپ افراد بیمار و کنترل اختلاف معنی داری وجود ندارد ($X^2=0/07$ df=1 $P=0/79$). و در یک مقایسه کلی، صرف نظر از جنسیت، که بین فراوانی ژنوتیپی دو گروه بیمار و کنترل انجام شد نیز تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود ($P=0/21$ df=2). نتایج حاصل از مقایسه ژنوتیپ GG با ژنوتیپ GA با استفاده از رگرسیون لجستیک، تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد (p -valu=0/95 و $OR=1/03$ و $95\%CI=0/56-1/89$). به ترتیب (۸۰/۸ درصد)، (۱۵۵/۲ درصد)، (۱۶/۳ درصد) و (۳۲ درصد) در افراد سالم به دست آمده از مقایسه فراوانی دو آلل G و A با استفاده از روش کای-اسکوئر، نشان می دهد تفاوت معنی داری بین افراد بیمار و کنترل وجود ندارد ($X^2=0/39$ df=1 $P=0/53$). همچنین در مقایسه فراوانی دو آلل G و A بین افراد دیابتی و گروه کنترل با استفاده از آنالیز رگرسیون لجستیک، تفاوت معنی داری دیده نشد (P -valu=0/53 و $OR=1/22$ و $95\%CI=0/73-2/06$). آنالیز واریانس یک طرفه که به منظور بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs3792267 با پارامترهای کلینیکی و بیوشیمیایی، صورت گرفت ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ های AA و GG و GA با دیگر پارامترها نشان نداد.

صرف نظر از جنسیت، ($X^2=5/8$ df=2 $P=0/055$) به دست آمد. با استفاده از رگرسیون لجستیک، و با در نظر گرفتن ژنوتیپ هموزیگوت GG به عنوان مبنا برای ژنوتیپ CG، (p -valu=0/54) و ($95\%CI=0/58-2/86$) $OR=1/29$ و برای ژنوتیپ CC، ($95\%CI=1/06-6/44$) $OR=2/62$ و (p -valu=0/37) به دست آمد که نتایج به دست آمده برای ژنوتیپ CG تفاوت معنی داری را بین گروه بیمار و گروه کنترل نشان نمی دهد، اما نتایج به دست آمده برای ژنوتیپ CC نشان می دهد که شانس ابتلای افراد با ژنوتیپ CC، ۲/۶۲ برابر افراد با ژنوتیپ GG است و این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار است. با فرض اینکه وجود یک آلل C می تواند احتمال خطر بیماری را بالا ببرد، در بین دو گروه بیمار و کنترل، مقایسه ای بین مجموع ژنوتیپ CC+CG نسبت به GG صورت گرفت.

میزان (p -valu=0/3 و $OR=1/61$ و $95\%CI=0/75-3/48$) برای CC+CG به دست آمد که نشان می دهد اختلاف معنی داری بین دو گروه بیمار و کنترل وجود ندارد. در گروه بیماران، توزیع فراوانی آلل های C و G به ترتیب (۶۰/۷۱ درصد) و (۳۹/۲۸ درصد) و در افراد سالم (۵۰ درصد) و (۹۶ درصد) برای هر آلل بود (جدول شماره ۷). نتایج حاصل از مقایسه فراوانی دو آلل C و G با استفاده روش کای-اسکوئر، نشان می دهد که همراهی معنی داری بین آلل C و بیماری دیابت نوع دو وجود دارد ($P=0/04$ df=2 $X^2=4/08$).

همچنین مقایسه فراوانی دو آلل C و G بین افراد دیابتی و گروه کنترل با استفاده از آنالیز رگرسیون لجستیک، تفاوت معنی داری را نشان داد (p -valu=0/04 و $OR=1/55$ و $95\%CI=1/03-2/31$). جهت بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs11196205 با پارامترهای کلینیکی و بیوشیمیایی، آنالیز واریانس یک طرفه انجام

جدول (۵): مشخصات دموگرافیکی و بیوشیمیایی افراد مورد مطالعه

گروه ژنوتیپ	بیمار			کنترل		
	مرد(N%)	زن(N%)	کل(N%)	مرد(N%)	زن(N%)	کل(N%)
CC	۱۵(۲۸/۸)	۱۹(۴۱/۳)	۳۴(۳۴/۶۹)	۱۲(۲۸/۶)	۷(۱۳)	۱۹(۱۹/۷۹)
CG	۳۱(۵۹/۶)	۲۰(۴۳/۵)	۵۱(۵۲/۰۴)	۱۸(۴۲/۸)	۴۰(۷۴)	۵۸(۶۰/۴۱)
GG	۶(۱۱/۵)	۷(۱۵/۲)	۱۳(۱۳/۲۶)	۱۲(۲۸/۶)	۷(۱۳)	۱۹(۱۹/۷۹)

جدول (۶): فراوانی ژنوتیپی افراد مورد مطالعه برای پلی مورفیسم rs11196205

خصوصیات	گروه بیمار	گروه کنترل	P-value
مرد	۵۲	۴۲	۰/۳
زن	۴۶	۵۴	۰/۴۲
سن	۵۲±۸/۸۹	۵۶/۳۶±۷/۱۷	<۰/۰۰۰۱
مدت ابتلا	۶/۲۶±۴/۰۲	-	-
BMI	۲۸/۵۱±۴/۸۸	۲۶/۴±۴/۳۳	۰/۰۰۱
FBS	۱۷۴/۸۴±۷۶/۷۷	۹۱/۳۵±۶/۵۵	<۰/۰۰۰۱
HbA1c	۸/۶۳±۲/۵۷	-	-
TG	۱۵۳/۰۹±۵۹/۴۸	۱۲۷/۸۵±۶۱/۹۶	۰/۰۰۱
TC	۱۸۶/۴۶±۴۸/۶۷	۱۸۶/۰۵±۵۴/۴۳	۰/۸۸

BMI: body mass index, FBG: fasting blood glucose, HbA1c: hemoglobin A1c, TG: triglyceride, TC: total cholesterol

جدول (۷): فراوانی آللی افراد مورد مطالعه برای پلی مورفیسم rs11196205

کنترل	بیمار	آلل
۹۶(٪۵۰)	۱۱۹(٪۶۰/۷۱)	C
۹۶(٪۵۰)	۷۷(٪۳۹/۲۸)	G

جدول (۸): فراوانی ژنوتیپی افراد مورد مطالعه برای پلی مورفیسم rs3792267

ژنوتیپ	بیمار			کنترل		
	مرد(٪)	زن(٪)	کل(٪)	مرد(٪)	زن(٪)	کل(٪)
GG	۳۱(٪۵۹/۶)	۳۵(٪۷۶/۱)	۶۶(٪۶۷/۳)	۲۳(٪۵۴/۸)	۳۹(٪۷۲/۲)	۶۲(٪۶۴/۶)
GA	۲۱(٪۴۰/۴)	۱۱(٪۲۳/۹)	۳۲(٪۳۲/۷)	۱۹(٪۴۵/۲)	۱۲(٪۲۲/۲)	۳۱(٪۳۲/۳)
AA	۰(٪۰)	۰(٪۰)	۰(٪۰)	۰(٪۰)	۳(٪۵/۶)	۳(٪۳/۱)

جدول (۹): فراوانی آللی افراد مورد مطالعه برای پلی مورفیسم rs3792267

کنترل	بیمار	آلل
۱۵۵	۱۶۴	G
۳۷	۳۲	A

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری دیابت نوع دو یکی از پرهزینه‌ترین بیماری‌های مزمن زمان ما و یک چالش بزرگ در جامعه مدرن است (۱۷). تأثیر منفی این بیماری بر روی زندگی و شرایط اقتصادی در سراسر جهان، ضرورت بسیج همگانی برای مبارزه با این بیماری را می‌طلبد و درک بهتر پاتوژنز و سیر طبیعی بیماری برای هدفمندسازی مناسب تلاش‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۱۸). اگرچه تصور می‌شود که تغییرات در شیوه زندگی ممکن است به دیابت نوع دو منجر شود اما

فقط در حضور عوامل خطر ژنتیکی برای این شرایط، فرد به دیابت نوع دو مبتلا می‌شود به همین دلیل، تلاش زیادی برای شناسایی ژن‌ها و بسیاری از جایگاه‌های مرتبط با این بیماری به عمل آمده است و همراهی تعداد زیادی از پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP ها) با دیابت نوع دو نشان داده شده است. می‌توان گفت دیابت نوع دو در خط مقدم بیماری‌های انسان و فنوتیپ‌های مورد مطالعه توسط تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی جدید بوده است (۱۲ و ۱۹). از میان تمام ژن‌های مرتبط با دیابت نوع دو، واریانت‌های

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Ezzidi و همکاران بر روی جمعیت عرب تونس انجام گرفت توزیع آلل و ژنوتیپ rs3792267 بین گروه بیماران و افراد کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت (۲۸). در ایران نیز در سال ۲۰۱۲ بحرینی و همکارانش مطالعه‌ای را بر روی جمعیت آذربایجان شرقی انجام دادند و آلل G به‌عنوان یک عامل خطر ابتلا به دیابت نوع دو در این جمعیت شناسایی شد. مطالعه دیگر که در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت مربوط به قومیت کرد شهر ایلام است که در این مطالعه همراهی معنی‌داری بین rs3792267 و دیابت نوع دو مشاهده نشد (۲۹ و ۳۰). در مطالعه حاضر، همراهی rs3792267 را با دیابت نوع دو در جمعیت قوم عرب استان خوزستان مورد بررسی قرار دادیم و به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت: که همراهی معنی‌داری بین پلی مورفیسم rs3792267 با بیماری دیابت نوع دو در جمعیت مورد مطالعه وجود ندارد. تفاوت و تنوع موجود در نتایج مطالعات ذکر شده و مطالعه حاضر می‌تواند تحت تأثیر عواملی مانند تفاوت‌های نژادی (نقش و اثر متفاوت واریانت‌های ژنتیکی موجود در جمعیت‌های نژادی مختلف)، مناطق جغرافیایی و اقلیمی مختلف، تفاوت در سبک زندگی افراد در جوامع مختلف، تفاوت در نمونه‌گیری از لحاظ ویژگی‌های دموگرافیکی مانند سن و جنس، تفاوت در تعداد نمونه‌ها در مطالعات مختلف، تفاوت در معیارهای تشخیص بیماری، روش انتخاب نمونه‌ها و تفاوت در روش‌های تعیین ژنوتیپ و تحلیل‌های آماری باشد. در این مطالعه به علت محدودیت زمانی ما نتوانستیم تعداد نمونه‌های بیشتری را جمع‌آوری کنیم؛ بنابراین این پیشنهاد می‌شود بررسی این پلی مورفیسم‌ها با تعداد نمونه‌های بیشتری در قومیت عرب استان خوزستان و دیگر استان‌های عرب نشین انجام شود تا بتوان با قاطعیت بیشتری در مورد همراهی یا عدم همراهی این پلی مورفیسم‌ها با دیابت نوع دو در جمعیت قوم عرب در ایران نظر داد. همچنین می‌توان با انجام مطالعات مشابه روی این واریانت-ها در سایر استان‌ها و قومیت‌های کشور، امکان یک برآورد کلی در جمعیت ایران و نیز در هر قومیت به‌طور مجزا را فراهم آورد. علاوه بر این می‌توان مطالعات مشابهی را با در نظر گرفتن عوامل محیطی انجام داد.

ژنتیکی در ژن TCF7L2 بیشترین همراهی را با این بیماری در بین قومیت‌های مختلف سراسر جهان نشان داده‌اند (۲۰). اما برخی مطالعات نیز، عمدتاً در جمعیت‌های آسیایی، وجود همراهی ضعیف و یا عدم وجود همراهی واریانت‌های TCF7L2 با دیابت نوع دو را گزارش کرده‌اند (۲۱ و ۲۲). در این پژوهش، همراهی پلی مورفیسم rs11196205 با بیماری دیابت نوع دو در جمعیت قوم عرب استان خوزستان مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، نشان داد که ژنوتیپ CC پلی مورفیسم rs11196205 همراهی معنی‌داری با دیابت نوع دو دارد. علاوه بر این، نتایج ما نشان می‌دهد که همراهی معنی‌داری نیز بین آلل C و بیماری دیابت نوع دو در جمعیت مورد مطالعه وجود دارد. در میان ژن‌های مربوط به دیابت نوع دو، ژن CAPN10 اولین ژنی بود که همراهی آن با این بیماری در آمریکایی‌های مکزیکی تبار تشخیص داده شد. هوریکاوا و همکارانش در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار گزارش دادند که هموزیگوسیتی آلل G در rs3792267 از ژن CAPN10، با دیابت نوع دو همراهی دارد (۲۳). بعد از آن مطالعات متعددی در کشورهای مختلف جهت بررسی همراهی پلی مورفیسم‌های ژن CAPN10 با بیماری دیابت نوع دو انجام گرفت که در قومیت‌های مختلف، نتایج متفاوتی گزارش شده است. نتایج مطالعه Ng و همکاران که در سال ۲۰۰۱ در جمعیت چین انجام شد همراهی rs3792267 و دیابت نوع دو را با $OR = ۲.۵$ نشان داد (۲۴). در مطالعه‌ای که توسط Evans و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در کشور انگلستان انجام شد همراهی معنی‌داری بین SNP-43، SNP-19، SNP-63 با دیابت نوع دو، به‌صورت انفرادی و یا به‌عنوان هاپلوتاایپ خطر مشاهده نشد (۲۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ توسط Garant و همکاران بر روی rs3792267 در آمریکاییان آفریقایی‌تبار انجام گرفت افرادی که دارای ژنوتیپ GG بودند با احتمال بیشتری نسبت به افراد با ژنوتیپ GA و یا AA در معرض ابتلا به دیابت نوع دو قرار داشتند (۲۶). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Iwasaki و همکاران بر روی پلی مورفیسم‌های شایع ژن CAPN10 در جمعیت ژاپن انجام شد، همراهی معنی‌داری بین rs3792267 با خطر ابتلا به T2DM مشاهده نشد (۲۷). در

References:

1. Singh S. The genetics of type 2 diabetes mellitus: a review. *J Sci Res* 2011;55: 35-48.
2. Gardner DG, Shoback DM, editors. *Greenspan's basic & clinical endocrinology*. New York: McGraw-Hill Medical; 2007 Jan 19.
3. Hindy G, Sonestedt E, Ericson U, Jing XJ, Zhou Y, Hansson O, Renström E, Wirfält E, Orho-Melander M. Role of TCF7L2 risk variant and dietary fibre intake on incident type 2 diabetes. *Diabetologia* 2012;55(10): 2646-54.

4. Conget I. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de cardiología*. 2002 Jan 1;55(5): 528-35.
5. Assmann TS, Duarte GC, Rheinheimer J, Cruz LA, Canani LH, Crispim D. The TCF7L2 rs7903146 (C/T) polymorphism is associated with risk to type 2 diabetes mellitus in Southern-Brazil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2014 Dec;58(9): 918-25.
6. Leutholtz BC, Ripoll I. Exercise and disease management. CRC Press; 2011 Apr 25.
7. Dabiri Sasan. Pathophysiology, prevention and treatment of type 2 diabetes over generations. *New J Med* 2012. 527. (Persian)
8. Huang ZQ, Liao YQ, Huang RZ, Chen JP, Sun HL. Possible role of TCF7L2 in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2018 Feb 1: 1-5.
9. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract* 2017;128: 40-50.
10. Azimi-Nezhad M, Ghayour-Mobarhan MP, Parizadeh MR, Safarian M, Esmaeili H, Parizadeh SM, et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Iran and its relationship with gender, urbanisation, education, marital status and occupation. *Singapore Med J* 2008;49(7): 571. (Persian)
11. WHO Media centre. Diabetes [Online]. 2012; Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en>.
12. Kommoju UJ, Reddy BM. Genetic etiology of type 2 diabetes mellitus: a review. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2011;31(2): 51-64.
13. Ling C, Groop L, Del Guerra S, Lupi R. Calpain-10 expression is elevated in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2009;4(8): e6558.
14. Jyothi KU, Jayaraj M, Subburaj KS, Prasad KJ, Kumuda I, Lakshmi V, et al. Association of TCF7L2 gene polymorphisms with T2DM in the population of Hyderabad, India. *PLoS One* 2013;8(4): e60212.
15. Kifagi C, Makni K, Mnif F, Boudawara M, Hamza N, Rekik N, et al. Association of calpain-10 polymorphisms with type 2 diabetes in the Tunisian population. *Diabetes Metab* 2008;34(3): 273-8.
16. Raj R, Ramteke PW. Polymorphisms of calpain 10 (Capn10) in type2 diabetes mellitus—a review. *Int J Sci Res* 2012;2(11).
17. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21(9): 1414-31.
18. Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosciences* 2007;32(2): 405-13.
19. Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS?. *Ann New York Academy Sci* 2010;1212(1): 59-77.
20. Basile KJ, Johnson ME, Xia Q, Grant SF. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: follow-up of findings from genome-wide association studies. *Int J Endocrinol* 2014;2014.
21. Chang YC, Chang TJ, Jiang YD, Kuo SS, Lee KC, Chiu KC. Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and type 2 diabetes in the Chinese population. *Diabetes*. 2007;56(10): 2631-7.
22. Zheng X, Ren W, Zhang S, Liu J, Li S, Li J. Association of type 2 diabetes susceptibility genes (TCF7L2, SLC30A8, PCSK1 and PCSK2) and proinsulin conversion in a Chinese population. *Molecular Biol Rep* 2012;39(1): 17-23.
23. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 2000;26(2): 163.

24. Ng MC, So WY, Critchley JA, Cockram CS, Chan JC. Association of calpain 10 genetic polymorphisms with type 2 diabetes and insulin response in non-diabetic Chinese. *Diabetes* 2001;50: A234.
25. Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, Saker PJ, Hitman GA, Walker M. Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am Hum Genetics* 2001;69(3): 544-52.
26. Garant MJ, Kao WL, Brancati F, Coresh J, Rami TM, Hanis CL, Boerwinkle E, Shuldiner AR. SNP43 of CAPN10 and the risk of type 2 diabetes in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes* 2002;51(1): 231-7.
27. Iwasaki N, Horikawa Y, Tsuchiya T, Kitamura Y, Nakamura T, Tanizawa Y, Oka Y, Hara K, Kadowaki T, Awata T, Honda M. Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population. *J Hum Genetics* 2005;50(2): 92-8.
28. Ezzidi I, Turki A, Messaoudi S, Chaieb M, Kacem M, Al-Khateeb GM, et al. Common polymorphisms of calpain-10 and the risk of Type 2 Diabetes in a Tunisian Arab population: a case-control study. *BMC Med Genetics* 2010;11(1): 75.
29. Bahreini F, Ardebili M, Mojtah S, Farajnia S, Ghareh Sooran J, Nabipour I, et al. A study on association of SNP-43 polymorphism in Calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in the population of Eastern Azerbaijan province. *ISMJ* 2012;15(1): 35-42. (Persian)
30. Haghani K, Aidi A, Mahmoudi K, Havasian MR, Panahi J, Karimfar MH, Bakhtiyari S. Analysis of the relationship between snp-43 polymorphism in calpain-10 gene and susceptibility to type 2 diabetes in ilam city. *J Zabol Univ Med Sci Health Serv* 6(2):9-17. (Persian)

ASSOCIATION OF TCF7L2 RS11196205(C/G) AND CAPN10 RS3792267 (G/A) POLYMORPHISMS WITH TYPE II DIABETES IN ARAB POPULATION OF KHUZESTAN PROVINCE

Abdollah Gravand¹, Ali Mohammad Foroughmand^{2*}, Mehdi Pourmehdi Boroujeni³

Received: 09 Jul, 2018; Accepted: 28 Sep, 2018

Abstract

Background & Aims: Type II diabetes is a multifactorial and heterogenic disease that is characterized by a defect in the production or function of insulin. In recent years, through Genome-wide association studies (GWAS) has been shown the association of several genes with Type II diabetes. The aim of this study was to investigate the relationship of polymorphisms *TCF7L2* rs11196205 and *CAPN10* rs3792267 with type II diabetes in the Arab population of Khuzestan province.

Materials & Methods: A case-control study was performed using 98 T2DM patients and 96 Controls. Genotyping for rs11196205 was done by TETRA-Primer ARMS-PCR and for rs3792267 was done by PCR-RFLP Technique.

Results: In examining rs11196205 based on the genotype GG, results for CG genotype were, OR = 1.29, 95%CI = (0.58–2.86), *P*-value = 0.54 and for genotype CC were, OR = 2.62, 95%CI = (1.06–6.44), *P*-value = 0.037. Also, the frequencies of C and G alleles in patients with diabetes were 60.71% and 39.28%, respectively, and in the healthy subjects was 50% for each of the alleles (OR = 1.55, 95%CI = (1.03–2.31), *P*-value = 0.04). There was no significant association with type II diabetes for rs3792267 in the studied population. **Conclusion:** Our results for *TCF7L2* rs11196205 polymorphism showed that CC genotype and C allele increase the risk of developing type II diabetes in the Arab population of Khuzestan province.

Keywords: *CAPN10* gene, rs11196205, rs3792267, *TCF7L2* gene, Type II diabetes

Address: Department of Genetics, School of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

Tel: +986632631406

E-mail: foroughmand.a@scu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2018; 29(8): 613 ISSN: 1027-3727

¹ Department of Genetics, School of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

² Associate Professor, Department of Genetics, School of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
(Corresponding Author)

³ Associate Professor, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran