مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۱، فروردین ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

مقایسه بیان ژن *ANGPTL4* در سلول‌های PBMC بیماران دیابتی و افراد سالم

میلاد ایجادی: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
ابوالفضل امیدی فر: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
حمید قائدی: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
فرانک کازرونی: دانشیار بیوشیمی بالینی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول)
f_kazerouni@sbmu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: دیابت نوع ۲ یک اختلال فراگیر شایع متابولیکی است که با ابتلا به بیماری‌های قلبی، کلیوی و سکته مغزی مرتبط می‌باشد. ژن *Angiopoietin-like 4*(*ANGPTL4*) یک پروتئین مهم ترشحی محسوب می‌شود که در تنظیم هومئوستاز نقش داشته و مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر حاکی از ارتباط این پروتئین با بیماری دیابت نوع ۲ است. در این مطالعه قصد داشتیم میزان بیان ژن *ANGPTL4* را در افراد مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با افراد سالم مورد بررسی قرار دهیم.

روش کار: در این مطالعه مورد–شاهدی، ۵۰ نفر بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۵۰ نفر از افراد سالم مراجعه‌کننده به بیمارستان شهدای تجریش وارد مطالعه شدند. میزان قند خون ناشتا (FBS) با استفاده از اتوانالایزر هیتاچی و سطح انسولین با روش الایزا اندازه‌گیری شد. لکوسیت‌های تک هسته‌ای (PBMC) را با استفاده از شیب چگالی ایجاد شده به وسیله محلول فایکول جداسازی نمودیم. پس از استخراج PBMC، RNA را با استفاده از کیت Gene All استخراج کردیم و برای بررسی میزان بیان ژنی از روش RT-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژنی ANGPTL4 در گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود. با این وجود، این کاهش از لحاظ اماری معنادار نبود ($p<۰/۰۶۲۵$).علاوه براین، نتایج نشان داد که میان FBS و بیان ژن ANGPTL4 همبستگی مثبت وجود دارد ($p<۰/۰۰۶۷$، $r=۰/۲۱۴$).

نتیجه‌گیری: میزان بیان ANGPTL4 در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه سالم کاهش یافته اما این کاهش معنادار نیست. باوجود مطالعات انجام شده در زمینه ارتباط ANGPTL4 و دیابت نوع دو، فهم ما از ارتباط و مکانیسم احتمالی آن کامل نبوده و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

کلیدواژه‌ها
دیابت نوع دو،
ANGPTL4،
آنژیوپویتین

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۱۱
تاریخ چاپ: ۰۰/۰۱/۱۶

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:
Ijadi M, Omidifar A, Ghaedi H, Kazerouni F. Comparison of ANGPTL4 gene expression in PBMC cells of type 2 diabetic patients and healthy subjects. Razi J Med Sci. 2021;28(1):23-33.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;28(1):23-33. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Comparison of ANGPTL4 gene expression in PBMC cells of type 2 diabetic patients and healthy subjects

Milad Ijadi: Department of Medical Laboratory Sciences, school of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Abolfazl Omidifar: Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Hamid Ghaedi: Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Faranak kazerouni: Associate Professor of Clinical Biochemistry, Department of Medical Laboratory Sciences, school of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding author) f_kazerouni@sbmu.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Type two diabetes mellitus (T2DM) is recognized as a metabolic disorder related to various complications such as heart disease, renal disease, and ischemic stroke. Type 2 diabetes is characterized by a defect in the insulin receptors on the cell membrane of the target cells, which in fact causes a kind of resistance or reduction of insulin sensitivity in the body. In recent years, various studies have been conducted on genes involved in diabetes, and research has revealed the fact that genes and gene interactions play an important role in pathogenesis as well as increasing the risk of diabetes. Given that type 2 diabetes accounts for about 25% to 25% in developed countries and even higher in developing countries, the prevention and care of this type of diabetes is of particular importance. The prevalence of type 2 diabetes has increased significantly in recent years in the world and in our country. In addition, unfortunately, we are witnessing a decrease in the age of onset of this disease. The ANGPTL4 is recognized as crucial protein that modulates glucose homeostasis and recent data suggest that ANGPTL4 may be correlated with the risk of type two diabetes. This protein is encoded in humans by the ANGPTL4 gene. This gene is a member of the angiopoietin family, which encodes a glycosylated secretory protein with an amino terminal domain containing compressed screws and a carboxyl end domain such as fibrinogen (11). This protein is expressed in mice and humans in a wide range of cells. In humans, it is more expressed in muscle, liver, kidney and intestine than other tissues, but the highest rate of expression is observed in humans in liver tissue. We sought to investigate ANGPTL4 expression in type 2 diabetic patients compared to healthy participants.
Methods: This study was a case-control study. Fifty patients with type 2 diabetes (15 males and 35 females) were included in the study group and 50 healthy individuals (18 males and 32 females) were included in the study. The subjects were gender matched. We recruited 50 patients with type 2 diabetes mellitus and 50 healthy individuals that referred to Shohadayeh Tajrish Hospital. FBS and insulin circulating levels were measured using Hitachi auto-analyzer and ELISA method respectively. We separated mononuclear leukocytes (PBMC) using a density gradient process following ficoll solution. Upon extraction of PBMC, we extracted RNA using Gene All kit. Then Real-time PCR method performed to assess the transcript levels of ANGPTL4. Written consent was obtained from all eligible individuals to agree to participate in the study, assuring them that the samples taken would only be used in this research project and

Keywords
Individual Motivation, Organizational Motivation, Athletes' Health, Provincial Sports Committees

Received: 01/12/2020
Published: 05/04/2021

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

that the results would be valid. This review will remain confidential. Quantitative data were analyzed using Kolmogorov-Smirnov test and if normal, using quantitative t test, quantitative data were compared between the two groups. Abnormal data were analyzed using Mann-Whitney test. Chi-square test was used to compare qualitative data between the two groups. Prism 6 software was used to analyze the data and data with $p<0.05$ were considered significant.

Results: This study was performed as a case-control study on 50 patients with type 2 diabetes and 50 healthy individuals as a control group. The demographic and clinical characteristics of the subjects are shown in Table 1. Due to the abnormal distribution of data, the data using the median and IQR, as well as to compare the differences between the two groups, the Mann-Whitney test was used. As shown in the table, the age range was 57 (43-69) in the diabetic group and 55 (49-64) in the healthy group ($p=0.058$).The ANGPTL4 gene expression in type 2 diabetic group was decreased compared with the healthy participants, but it was not statistically significant ($p<0.065$). Overall, our results demonstrate that there is a positive correlation between FBS and ANGPTL4 expression ($r= 0.214$, $p<0.0067$). The average body mass index in the diabetic group was 27.9 (29-24) Kg / m2 and in the healthy group was 26 (28-23) Kg / m^2. The results also showed that the mean blood sugar in the diabetic group was 139 (125.3-180) and in the healthy group was 91 (99-84). Statistical analysis showed that there was a significant difference between the blood sugar results of the two groups ($p=0.001$).

Conclusion: Recent studies have shown that ANGPTL4 plays an important role in glucose homeostasis, pathogenesis of diabetes as well as metabolic syndrome. However, studies have not been sufficient and in some studies, contradictory results are observed. Therefore, the present study was designed to evaluate and compare the expression of ANGPTL4 gene with indices associated with people with type 2 diabetes compared with healthy individuals. In this study, it was found that serum levels of FBS (P value <0.001) and HOMA-IR in the diabetic group increased compared to the control group. While no significant difference was observed between other parameters such as BMI. Also, due to matching the control and patient groups in terms of age and selection from both male and female groups, no significant difference in terms of age and sex was observed between the two groups. The level of expression of ANGPTL4 in participants with type 2 diabetes has diminished. The results of the present study showed that the expression level of ANGPTL4 gene in diabetic individuals decreases compared to healthy individuals. In addition, the expression of this gene is positively correlated with fasting blood sugar. However, the association of this molecule with glucose metabolism as well as the pathogenesis of diabetes has not been fully investigated. It seems that despite the studies on the relationship between ANGPTL4 and type 2 diabetes, our understanding of this relationship and mechanism is still incomplete and more studies are needed in this field. It is suggested that in future studies, the level of ANGPTL4 in the serum of individuals Diabetes and its relationship with biochemical parameters such as HDL-c and LDL-c as well as the enzyme lipoprotein lipase should be examined. It seems that despite studies on the relationship between ANGPTL4 and type 2 diabetes, we unable to describe the possible relationship and mechanism of ANGPTL4 in metabolic pathways. Further studies are needed to investigate this notion.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Ijadi M, Omidifar A, Ghaedi H, Kazerouni F. Comparison of ANGPTL4 gene expression in PBMC cells of type 2 diabetic patients and healthy subjects. Razi J Med Sci. 2021;28(1):23-33.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

امروزه معضل بیماری‌های غیر عفونی، بسیاری از باورهای بهداشتی را تحت‌الشعاع قرار داده و توجّه جوامع علمی را به خود معطوف داشته است (۱). در گذشته‌ای نه چندان دور مشکل اصلی جامعه و مردم، بیماری‌های واگیر و مرگ ومیر بالای ناشی از این بیماری‌ها بود، درحالی‌که در حال حاضر به علت کنترل بیماری‌های واگیر، توسعه شهرنشینی، پیشرفت صنعت و زندگی ماشینی، شیوع بیماری‌های غیرواگیر افزایش یافته و رفته‌رفته بیماری‌های واگیر جای خود را به بیماری‌های غیرواگیر داده‌اند، به صورتی که امروزه مهم‌ترین علل مرگ ومیر در جوامع، بیماری‌های غیرواگیر خصوصاً بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان‌ها و سوانح و حوادث می‌باشد. به عبارتی ۵۲٪ کل مرگ‌های دنیا و ۲۰٪ بار جهانی بیماری‌ها ناشی از بیماری‌های غیرواگیر است که مسئول ۷۴٪ هزینه‌های پزشکی هستند(۲). دیابت یک بیماری مزمن غده درون‌ریز می‌باشد که ویژگی آن سوء عملکرد در سوخت‌وساز گلوکز، ناشی از اشکالاتی در تولید یا بهره‌گیری از هورمون انسولین است. این بیماری سه شکل اصلی دارد: ۱- نوع یک یا وابسته به انسولین T1D ۲- نوع دو یا غیر وابسته به انسولین T2DM ۳- دیابت بارداری

دیابت نوع دو، با نقص در گیرنده‌های انسولین بر روی غشاء سلولیِ سلول‌های هدف مشخص می‌گردد که درواقع در این حالت نوعی مقاومت یا کاهش حساسیت به انسولین در بدن ایجاد می‌شود. دیابت نوع دو، در اثر برهمکنش متقابل عوامل وراثتی، محیطی و رفتاری در افراد به وجود می‌آید(۳،۴). در عین حال شواهد زیادی بیان‌کننده این مطلب هستند که فاکتورهای خطر قابل تعدیل مانند چاقی و کم‌تحرکی به‌عنوان مهم‌ترین عوامل غیر ژنتیکی ایجاد این بیماری محسوب می‌شوند. اگرچه درمان‌های پزشکی نقش مهمی در کاهش عوارض مخرب این بیماری دارد اما معمولاً قادر به بر طرف کردن همه آن‌ها و همچنین برگرداندن سطح گلوکز خون به حد نرمال نیستند (۵). به عبارتی علیرغم پیشرفت‌های موجود در عرصه پزشکی، درمان قطعی‌ای برای این بیماری یافت نشده است، ولی می‌توان از طریق کاهش وزن بدن، افزایش فعالیت بدنی و تغییرات رژیم غذایی و به‌طورکلی تغییر سبک زندگیِ فرد بیمار، این بیماری را کنترل نمود و از پیشرفت عوارض آن جلوگیری کرد. ولی بسیاری از بیماران باوجود اطلاع از عوارض بیماری به توصیه‌های پزشکی و درمانی به‌طور کامل عمل نمی‌کنند و درنتیجه احتمال گسترش عوارض مربوط به دیابت افزایش می‌یابد (۶،۷).

در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی بر روی ژن‌های دخیل در دیابت انجام شده است و تحقیقات این حقیقت را آشکار ساخته است که ژن‌ها و برهمکنش‌های ژنی نقش مهمی در بیماری‌زایی و همچنین افزایش خطر ابتلا به دیابت را دارا می‌باشند (۸). ژن (*ANGPTL4*) Angiopoietin-like protein 4 از جمله ژن‌هایی است که در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی بر روی انجام شده است و نشان داده شده است که این پروتئین با دیابت نوع دو مرتبط می‌باشد. *ANGPTL4* پروتئینی را کد می‌کند که توسط کبد و بافت چربی سفید ترشح شده و می‌تواند فعالیت لیپوپروتئین لیپاز را تحریک کند (۹). این پروتئین در انسان به‌وسیله ژن *ANGPTL4* کد می‌شود. این ژن یکی از اعضای خانواده angiopoietin است که یک پروتئین ترشحی گلیکوزیله به همراه دمین انتهای آمینی حاوی پیچ‌های فشرده و دمین انتهای کربوکسیل همانند فیبرینوژن را کد می‌کند (۱۱). این پروتئین در موش و انسان در طیف گسترده‌ای از سلول‌ها بیان می‌شود. در انسان در ماهیچه، کبد، کلیه و روده بیان بیشتری نسبت با سایر بافت‌ها داشته اما بیشترین میزان بیان آن در انسان در بافت کبد مشاهده می‌شود (۸،۱۲). مطالعات نشان داده است که میزان بیان ژنی *ANGPTL4* در افراد مبتلا به رتینوپاتی دیابتی افزایش می‌یابد. برخلاف این موضوع، مطالعات بیشتر نشان داده است که بیان ژن *ANGPTL4* در حالت دیابت نوع دو کاهش می‌یابد. علاوه براین تحقیقات نشان داده است که سطح سرمی *ANGPTL4* در افراد مبتلا به دیابت نوع دو افزایش می‌یابد. *ANGPTL4* می‌تواند به طور موثری کلیرانس تری گلیسرید را مهار کند و باعث افزایش تری گلیسرید سرم از طریق مهار آنزیم لیپوپروتئین لیپاز شود. مطالعات بیوشیمیایی نشان داده است که *ANGPTL4* باعث تبدیل فرم فعال لیپوپروتئین لیپاز (LPL) به فرم غیرفعال آن (مونومر)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

شده و بدین ترتیب لیپوپروتئین لیپاز را غیر فعال می‌کند. در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت اروپایی و آمریکایی انجام گرفته است، نشان داده شده است که ANGPTL4 رابطه معکوسی با HDL دارد. در مطالعه اخیر نیز نشان داده شده است که سطح سرمی ANGPTL4 در افراد مبتلا به دیابت نوع دو و سندرم متابولیک افزایش یافته و این پروتئین با HDL در این بیماران رابطه معکوس دارد.

T2DM یک اختلال ژنتیکی هتروژن است که فاکتورهای محیطی، ژنتیکی و رفتاری در بیماری‌زایی آن نقش دارند (۱۳). مطالعات اخیر بیشترین تأکید را بر اهمیت فاکتورهای ژنتیکی در بیماری‌زایی دیابت نوع دو دارند. براین اساس ژن‌های متعددی در ارتباط با دیابت نوع دو مورد بررسی قرار گرفته‌اند ولی هنوز مکانیسم ژنتیکی خاصی برای آن شناخته نشده است (۱۴،۱۵). با توجه به اینکه دیابت نوع دو، در کشورهای توسعه‌یافته حدود ۶۵ درصد و در کشورهای درحال توسعه حتی درصد بالاتری از انواع بیماری دیابت را شامل می‌شود بنابراین پیشگیری و مراقبت از این نوع دیابت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شیوع دیابت نوع دو طی سالیان اخیر در دنیا و نیز در کشور ما افزایش قابل‌توجهی یافته است. علاوه بر این متأسفانه شاهد کاهش سن ابتلا به این بیماری می‌باشیم. با توجه به آخرین آمارهای سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۲، برآورد می‌شود که در حدود ۱۴۹ میلیون نفر در سراسر جهان یا ۵،۱ درصد از جمعیت بالغ، مبتلا به دیابت باشند و این رقم تا سال ۲۰۲۵ به ۳۳۳ میلیون یا ۶،۳ درصد افزایش خواهد یافت. در همین راستا با توجه به شیوع بالای دیابت نوع دو در کشور، در صورتی که ارتباط بیان ژنی ANGPTL4 با دیابت نوع دو مشخص گردد، ممکن است بتواند به فهم بهتر مکانیسم این بیماری و همچنین در کنترل و بهبود این بیماری ثمربخش باشد.

روش کار

این مطالعه به روش مورد-شاهدی انجام گرفت. ۵۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو (۱۵ نفر مرد و ۳۵ نفر زن) به‌عنوان گروه بیمار و ۵۰ فرد سالم (۱۸ نفر مرد و ۳۲ نفر زن) به‌عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. افراد مورد مطالعه از لحاظ جنسیت همسان‌سازی شدند.

گروه سالم شامل افراد در محدوده سنی بین ۷۵-۳۵ سال بود که گلوکز ناشتای زیر mg/dl ۱۰۰ داشته و از بین داوطلبین مراجعه‌کننده به مرکز بیمارستان شهدای تجریش تهران انتخاب شدند. گروه بیمار شامل افراد در همین محدوده سنی بودند که با توجه به معیار انجمن دیابت آمریکا (ADA)، قند خون ناشتای بیش از ۱۲۶mg/dL یا HbA1C بیش از ۶،۵ و یا قند دو ساعته بیش از mg/dL ۲۰۰ داشتند. معیارهای ورود به مطالعه برای افراد مبتلا به T2DM عبارت بودند از: ۱- تشخیص پزشک متخصص غدد ۲- عدم سابقه بیماری‌های اندوکرین از قبیل پرکاری یا کم کاری تیروئید ۳- عدم سابقه بیماری‌های کبدی از قبیل هپاتیت ۴- عدم ابتلا به بیماری‌های عفونی و التهابی ۵- عدم دریافت انسولین. همچنین معیارهای ورود به مطالعه برای گروه کنترل عبارت بودند از: ۱- گلوکز ناشتای کافی ۲- عدم ابتلا به بیماری‌های کبدی، عفونی و التهابی ۳- نداشتن سابقه فامیلی دیابت در بستگان درجه یک. در صورت نداشتن هر یک از معیارهای ذکر شده، افراد از مطالعه خارج شدند.

از همه‌ی افراد واجد شرایط برای شرکت در پژوهش، رضایت‌نامه‌ی کتبی جهت موافقت و همراهی در این کار اخذ گردید و به آن‌ها این اطمینان داده شد که نمونه‌های گرفته‌شده فقط در این پروژه‌ی تحقیقاتی مورد استفاده قرارگرفته و نتایج حاصل از این بررسی به صورت محرمانه باقی خواهد ماند. همچنین، این پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مورد تایید قرار گرفت (IR.SBMU.RETECH.REC.1397.1101). داده‌های تن‌سنجی (قد، وزن، دور کمر، فشارخون، BMI) نیز برای هر دو گروه کنترل و بیمار اندازه‌گیری شد و در پرسشنامه ثبت گردید. میزان قند خون ناشتا (FBS) به وسیله دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی و انسولین با استفاده از روش الایزا در آزمایشگاه بیمارستان شهدای تجریش اندازه‌گیری شدند. به دلیل دسترسی راحت و آسان، برای جداسازی لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌های انسانی (لکوسیت‌های تک‌هسته‌ای، PBMCs) از خون محیطی به‌عنوان منبع اصلی استفاده می‌شود. جداسازی لنفوسیت‌ها با استفاده از سانتریفیوژ به روش شیب

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

چگالی روشی سریع و پرکاربرد بوده که می‌تواند لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها را از گرانولوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها جدا نماید. در این مطالعه، جداسازی PBMCs با استفاده از شیب چگالی ایجاد شده به وسیله محلول جداسازی فایکول با چگالی ۱۰،۰۷۷ g/cm3 انجام گرفت. برای استخراج PBMCs در مدت زمان کمتر از دو ساعت از زمان خونگیری، لوله های ضدانعقاد حاوی نمونه خون به ازمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشکده پیراپزشکی انتقال داده شد و سپس مراحل استخراج با استفاده از پروتکل مربوطه انجام شد. استخراج RNA در محیط استریل و عاری از هرگونه آلودگی انجام شد. کلیه مراحل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی گراد و بر روی یخ انجام پذیرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت (NanoDrop™ 2000/2000c، Thermo Fisher Scientific). سنتز cDNA طبق پروتکل کیت تاکارا و با استفاده از پرایمرهای oligodt و Random hexamer به‌عنوان الگو انجام شد. برای بررسی بیان ژن از تکنیک Real Time PCR استفاده شد. از رنگ فلوئورسانس سایبرگرین طی یک واکنش دو مرحله ای جهت سنجش بیان ژن استفاده شد. از ژن GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از:

ژن:GAPDH

Forward – 5’TGCACCACCAACTGCTTAGC 3’

Reverse – 5’GGCATGGACTGTGGTCATGAG3’

ژن:ANGPTL4

Forward – 5’TCTCCGTACCCTTCTCCACT3’

Reverse – 5’AGTACTGGCCGTTGAGGTTG3’

همچنین، اندازه‌گیری تغییرات غلظت سرمی انسولین بیماران دیابتی با استفاده از کیت الایزا (آمریکا) Monobind انجام شد. حساسیت این کیت 0.75 µIU/ml می‌باشد و محدوده قابل سنجش در این کیت 0.7-25 µIU/ml می‌باشد.

تجزیه و تحلیل نتایج: داده های کمی با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت نرمال بودن با استفاده از آزمون Sample t test داده های کمی میان دو گروه مقایسه شدند. داده های غیرنرمال با استفاده از آزمون من ویتنی مورد بررسی قرار گرفتند. برای مقایسه داده های کیفی بین دو گروه از ازمون کای دو استفاده شد. جهت انالیز داده ها از نرم افزار Prism 6 استفاده شد و داده های با P< ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

این مطالعه به‌عنوان یک مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو و ۵۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل انجام شد. مشخصات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. به دلیل توزیع غیر نرمال داده ها، داده ها با استفاده از میانه و IQR وهمچنین برای مقایسه تفاوت بین دو گروه نیز از آزمون Mann-whitney بهره گرفته شده است. همان طور که در جدول نشان داده شده است محدوده سنی در گروه دیابتی ۵۷ (۴۳-۶۹) و در گروه سالم ۵۵ (۴۹-۵۴) بود (p=۰/۰۵۸).

علاوه براین، میانگین شاخص توده بدن در گروه دیابتی $۲۷/۹Kg/m^2$ (۲۴-۲۹) و در گروه سالم $۲۶Kg/m^2$ (۲۳-۲۸) بوده است. همچنین نتایج نشان داد که میانگین قند خون در گروه دیابتی ۱۳۹ (۱۲۵/۳-۱۸۰) و در گروه سالم ۹۱ (۸۴-۹۹) بود. آنالیز های آماری نشان داد که تفاوت معناداری میان نتایج قند خون دو گروه وجود دارد (p=۰/۰۰۱).

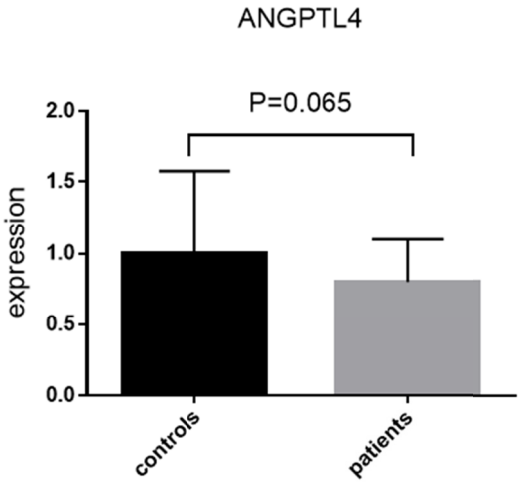
همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است میزان بیان ژنی ANGPTL4 در گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. با این وجود، این کاهش از لحاظ اماری معنادار نبود (p<۰/۰۶۵). نتایج نشان داد که میزان بیان ANGPTL4 در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به میزان حدودا ۰/۲ برابر کاهش یافته است اما این کاهش معنادار نمی‌باشد.

علاوه براین، نمونه ای از منحنی ذوب و تکثیر که توسط دستگاه ریل تایم رسم شده است در شکل ۲ و شکل ۳ آورده شده است. از منحنی ذوب نمونه ها برای بررسی اختصاصیت پرایمرها در واکنش PCR استفاده گردید. وجود یک تک پیک نشان دهنده عدم دایمر

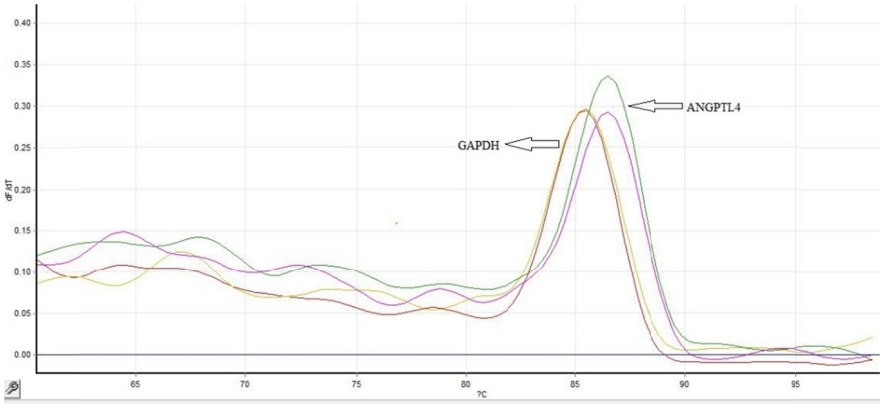
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۱- ویژگی های بیوشمیایی و تن سنجی افراد مورد مطالعه

Characteristics	Diabetes	Healthy controls	Mann-Whitney U
	Median (IQR)	Median (IQR)	p-value
Age (yr)	57(43-69)	55 (49-64)	0.058
BMI (kg/m^2)	27.9 (24-29)	26 (23-28)	0.818
Weight(Kg)	69.5(58-80)	66(50-75)	0.68
Height(cm)	163(152.3-170.9)	161(153.2-168-5)	0.116
FBS (mg/dL)	139(125.3-180)	91 (84-99)	0.001*
Insulin	17.10(9-28)	9-14.7(13.5)	0.021*
HbA1c	7.2(6.8-7.9)	5.2 (4.7-5.5)	0.011*
HOMA-IR	6.13(3.5-9.87)	1.5 (1.1-2.3)	0.001*



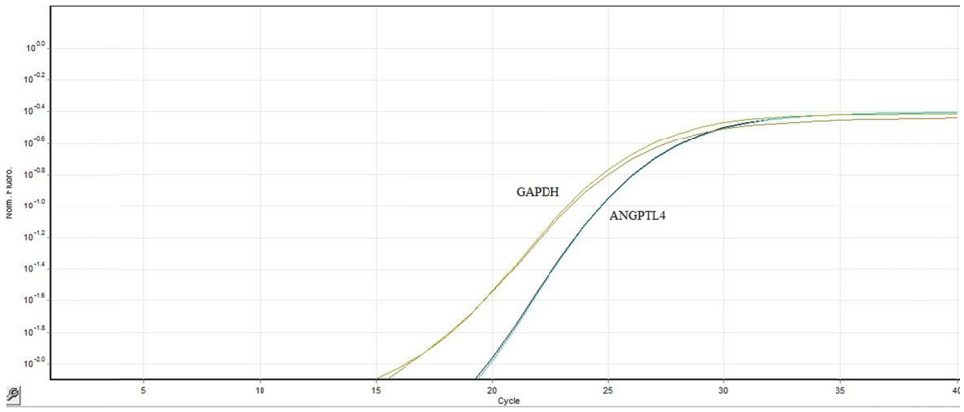
شکل ۱- مقایسه بیان ژن ANGPTL4 در افراد سالم در مقایسه با افراد دیابتی



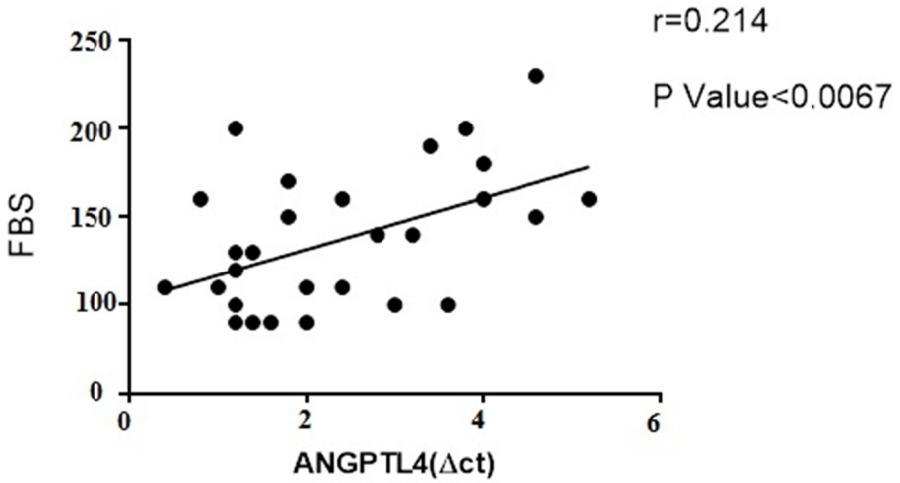
شکل ۲- منحنی ذوب مربوط به ژن های GAPDH و ANGPTL4

پرایمر و قطعات غیراختصاصی در محصول PCR است. منحنی تکثیر بیانگر صحت انجام واکنش PCR می‌باشد که برای هر واکنش PCR رسم و قابل بررسی است. همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود فازهای تکثیر لگاریتمی و کفه ای ((Plateau کاملا واضح می‌باشد. فاز لگاریتمی جهت ارزیابی بیان ژن در سیستم Real Time PCR مورد استفاده قرار می گیرد. برای بررسی ارتباط بین بیان ژن ANGPTL4

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]



شکل ۳- منحنی تکثیر مربوط به ژن های GAPDH و ANGPTL4



شکل ٤- همبستگی مثبت میان FBS و بیان ژنی ANGPTL4

باپارامترهای بیوشیمیایی و فاکتورهای آنتروپومتریک از linear regression استفاده شد. نتایج نشان داد که میان FBS و بیان ANGPTL4 همبستگی وجود دارد. درواقع میان بیان ژنی ANGPTL4 و FBS ارتباط مستقیم وجود دارد (r=۰/۲۱۴ ،p=۰/۰۰۶۷).

بحث

باتوجه به روند روبه گسترش و عوارض گسترده دیابت نوع ۲ تلاش های بسیاری در سراسر جهان در راستای دستیابی به درمان قطعی دیابت در حال انجام می‌باشد. مطالعات مختلفی بر روی ژن‌های دخیل در متابولیسم و بویژه ژن‌های موثر بر سندرم متابولیک، دیابت و چاقی انجام گرفته است (۱۶). از میان این ژن‌ها، خانواده angiopoietin مورد توجه محققان قرار گرفته است. ANGPTL4 یکی از اعضای این خانواده است که به تازگی مطالعات مختلفی بر روی ان معطوف شده است. ژن ANGPTL4 پروتئینی را کد می‌کند که باعث تحریک گیرنده فعال کننده تکثیر پراکسی زومی (PPARγ) شده و همچنین به‌عنوان یک هورمون موجود در سرم باعث تنظیم هومئوستاز گلوکز، متابولیسم لیپید و حساسیت به انسولین می‌شود (۱۷،۱۸). این پروتئین همچنین به‌عنوان یک فاکتور حیاتی در فرآیند آپوپتوز برای سلول‌های اندوتلیال عروقی محوسب می‌شود و می‌تواند با مهار رشد عروق خونی و تهاجم سلول‌های توموری از متاستاز جلوگیری کند (۱۹،۲۰).

بیشترین میزان ANGPTL4 در سلول‌های کبدی، ماهیچه ای، آدیپوسیت ها، سلول‌های گلیا و ماکروفازها

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

وجود دارد (۷). ANGPTL4 در حالت ترشحی با جدا شدن ناحیه تنظیمی در انتهای آمینی و قسمت مونومریک انتهای کربوکسیلی به فرم کامل و فعال خود در می‌آید. انتهای امینی این پروتئین مسئول اولیگومریزاسیون بوده که باعث می‌شود ANGPTL4 بتواند فعالیت LPL را مهار کند. قسمت انتهای کربوکسیلی با اینتگرین ها و پروتئین های ماتریکس خارج سلولی برهمکنش می‌کند تا به چسبندگی و مهاجرت مولکول کمک کند (۱۱).

نتایج مطالعات اخیر حاکی از ان بوده است که ANGPTL4 در هومئوستاز گلوکز، پاتوزنز دیابت و همچنین سندرم متابولیک نقش مهمی را ایفا می‌کند. با این وجود، مطالعات انجام شده کافی نبوده و در برخی از مطالعات نیز نتایج متناقض مشاهده می‌شود. به همین دلیل مطالعه حاضر جهت بررسی و مقایسه بیان ژنی ANGPTL4 با شاخص های مرتبط با افراد مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با افراد سالم طراحی گردید. در این راستا در این مطالعه مشخص شد که سطوح سرمی FBS (P value<0.001) و HOMA-IR در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. درحالی‌که بین سایر پارامترهااز جمله BMI هیچ تفاوت معناداری مشاهده نشد. همچنین به دلیل همسان کردن گروه کنترل و بیمار از نظر سن و انتخاب از هر دو گروه مرد و زن، تفاوت معناداری از نظر سن و جنس بین دو گروه مشاهده نشد. از دیگر نتایج این مطالعه‌این بود که میزان بیان ژنی ANGPTL4 در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود اما این کاهش از نظر آماری معنادار نبود (p<0.065). درواقع نتایج نشان داد که بیان ANGPTL4 در گروه دیابتی در مقایسه با گروه سالم به میزان حدودا ۰,۲ برابر کاهش یافته است اما این کاهش از لحاظ آماری معنادار نیست. در مطالعه انجام شده توسط NAGAIKE و همکاران نشان داده شده است که میزان بیان ANGPTL4 در افراد دیابتی در مقایسه با افراد سالم به طور معناداری کاهش می‌یابد (۸). در این پژوهش نیز ANGPTL4 در گروه دیابتی کاهش نشان داد اما این کاهش از لحاظ اماری معنادار نبود.

علاوه براین، در مطالعه حاضر نشان داده شد که میان بیان ژنی ANGPTL4 و FBS همبستگی معکوسی وجود دارد. نتایج این مطالعه همسو با مطالعه Romeo و همکاران می‌باشد که در ان مطالعه نشان داده شد که همبستگی معکوسی میان FBS و ANGPTL4 وجود دارد (۶). Yang و همکاران در مطالعه‌ای سطح سرمی ANGPTL4 را در افراد دیابتی در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار دادند. علاوه براین ارتباط سطح سرمی ANGPTL4 با پارامترهای بیوشیمیایی همچون LDL، HDL و تری گلیسیرید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح سرمی ANGPTL4 در بیماران T2DM افزایش می‌یابد (۹). همچنین میان سطح سرمی ANGPTL4 و LDL و HDL ارتباط معناداری وجود داشت. در مطالعه حاضر سایر پارامترهای بیوشیمیایی همچون TG،HDL،LDL مورد بررسی قرار نگرفته است. همچنین سطح سرمی ANGPTL4 نیز در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفته است. علاوه براین، در برخی مطالعات مختلف ارتباط این ژن با برخی آنزیم LPL و HDL بررسی شده است. در مطالعه Lafferty و همکاران نشان داده شده است که افزایش فعالیت LPL در موش های ANGPTL4-null می‌تواند باعث کاهش میزان تری گلیسیرید در خون شود (۲۱). Metha و همکاران در مطالعه‌ای جمعیت اروپایی و امریکایی را مورد مطالعه قرار دادند (۲۲). نتایج این مطالعه نشان داد که رابطه معکوسی میان ANGPTL4 و HDL وجود دارد. مطالعه انجام شده توسط Dewey و همکاران نیز نتایج مشابهی را در پی داشت. در این مطالعه واریانت های مختلف ANGPTL4 در جمعیت اروپایی مورد شناسایی قرار گرفت (۲۳). به طور مثال این مطالعه نشان داد افرادی که حاوی جهش E40K در ANGPTL4 می‌باشد، میزان HDL بالاتری را نسبت به افرادی دارند که این جهش را نداشته اند و در نتیجه در افراد حامل جهش در E40K، ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی به مراتب کمتر می‌باشد. علاوه براین، در مطالعه‌ای که اخیرا توسط Tjeerdema و همکاران انجام گرفته است، نشان داده شده است که سطح سرمی ANGPTL ۴ در افراد مبتلا به T2DM و سندرم متابولیک افزایش می‌یابد درحالی‌که میزان HDL در هر دو این بیماران کاهش می‌یابد (۲۴).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشـان داد کـه میـزان بیـان ژنـی ANGPTL4 در افراد دیابتی در مقایسه بـا افـراد سـالم کاهش پیدا میکند. علاوه براین میزان بیـان ایـن ژن بـا قند ناشتای خون همبستگی مثبت دارد. بـا ایـن وجـود ارتباط این مولکـول بـا متابولیسـم گلـوکز و همچنـین پاتوژنز بیماری دیابت به طور کامل مـورد بررسـی قـرار نگرفته است. به نظر می رسـد بـاوجود مطالعـات انجـام شـده در زمینـه ارتبـاط ANGPTL4 و دیابـت نـوع دو هنوز فهم ما از این ارتباط و مکانیسم کامل نبوده و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه مـی‌باشـد. پیشـنهاد می‌شود در مطالعات آتی، میـزان ANGPTL4 در سـرم افراد دیابتی و ارتباط آن با پارامترهـای بیوشـیمیایی از جمله HDL-c و LDL-c و همچنین آنزیم لیپوپروتئین لیپاز مورد بررسی قرار گیرد.

References

1. American Diabetes A. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2010;33(Suppl 1):S62-S9.
2. Arabi M, Rasi V. The relation between body mass index and prevalence of ischemic heart disease in type 2 diabetic patients. Razi J Med Sci. 2019;26(2):85-92
3.Fonseca VA, Kirkman MS, Darsow T, Ratner RE. The American Diabetes Association Diabetes Research Perspective. Diabetes Care. 2012;35(6):1380.
4. Health Quality O. Behavioural Interventions for Type 2 Diabetes: An Evidence-Based Analysis. Ontario Health Technol Assess Series. 2009;9(21):1-45.
5. Health Quality O. Continuous Subcutaneous Insulin Infusion (CSII) Pumps for Type 1 and Type 2 Adult Diabetic Populations: An Evidence-Based Analysis. Ontario Health Technol Assess Series. 2009;9(20):1-58.
6. Romagnolo DF, Selmin OI. Mediterranean Diet and Prevention of Chronic Diseases. Nutr Today. 2017;52(5):208-22.
7. Kastorini C-M, Panagiotakos DB. Mediterranean diet and diabetes prevention: Myth or fact? World J Diabetes. 2010;1(3):65-7.
8. Ortega-Senovilla H, van Poppel MNM, Desoye G, Herrera E. Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is related to gestational weight gain in pregnant women with obesity. Sci Rep. 2018;8:12428.
9. Yang X, Cheng Y, Su G. A review of the multifunctionality of angiopoietin-like 4 in eye disease. Biosci Rep. 2018;38(5).
10. van der Kolk BW, Vink RG, Jocken JWE, Roumans NJT, Goossens GH, Mariman ECM, et al. Effect of diet induced weight loss on angiopoietin like protein 4 and adipose tissue lipid metabolism in overweight and obese humans. Physiol Rep. 2018;6(13):e13735.
11. Martínez-González MÁ, de la Fuente-Arrillaga C, Nunez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Vazquez Z, et al. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. Br Med J. 2008;336(7657):1348-51.
12. Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. J Gerontol Series A. 2018;73(3):318-26.
13. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. Diabetes Care. 2004;27(5):1047.
14. Aldossari KK. Cardiovascular outcomes and safety with antidiabetic drugs. Int J Health Sci. 2018;12(5):70-83.
15. McHugh KR, DeVore AD, Mentz RJ, Edmonston D, Green JB, Hernandez AF. The Emerging Role of Novel Antihyperglycemic Agents in the Treatment of Heart Failure and Diabetes: A Focus on Cardiorenal Outcomes. Clin Cardiol. 2012;12(4): 8-16
16. Barfeie F, Salehi M, Najafi I. Predicting diabetes using artificial neural network. Razi J Med Sci. 2015; 22 (135) :29-37
17. Wynne K, Devereaux B, Dornhorst A. Diabetes of the Exocrine pancreas. J Gastroenterol Hepatol. 2014;8(2):235-239.
18. Stull AJ. Lifestyle Approaches and Glucose Intolerance. Am J Lifestyle Med. 2016;10(6):406-16.
19. Ribeiro RA, Bonfleur ML, Batista TM, Borck PC, Carneiro EM. Regulation of glucose and lipid metabolism by the pancreatic and extra-pancreatic actions of taurine. Amino Acids. 201;12(1).
20. Ajčević M, De Dea F, Barbieri G, Accardo A, editors. A Mobile App for the Self-management of Type 1 Diabetes as Tool for Preventing of Exercise-Associated Glycemic Imbalances. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering. 2018.
21. Lafferty MJ, Bradford KC, Erie DA, Neher SB. Angiopoietin-like Protein 4 Inhibition of Lipoprotein Lipase: EVIDENCE FOR REVERSIBLE COMPLEX FORMATION. J Biol Chem. 2013;288(40):28524-34.
22. Mehta N, Qamar A, Qu L, Qasim AN, Mehta NN, Reilly MP, et al. Differential Association of Plasma Angiopoietin-Like Proteins 3 and 4 with Lipid and Metabolic Traits. Arterioscleros Thrombos Vasc Biol. 2014;34(5):1057-63.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

23. Dewey FE, Gusarova V, O'Dushlaine C, Gottesman O, Trejos J, Hunt C, et al. Inactivating Variants in ANGPTL4 and Risk of Coronary Artery Disease. N Eng J Med. 2016;374(12):1123-33.

24. Tjeerdema N, Georgiadi A, Jonker JT, van Glabbeek M, Dehnavi RA, Tamsma JT, et al. Inflammation increases plasma angiopoietin-like protein 4 in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. BMJ Open Diabetes Res Care. 2014;2(1):e000034.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]