مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۹
http://rjms.iums.ac.ir
مقاله پژوهشی

آنالیز پیوستگی ژنتیکی ژن‌های *GCK* و *HNF1A* در جمعیتی از خانواده‌های مبتلا به MODY در استان اصفهان

اکرم سرمدی: کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
محمد امین طباطبائی‌فر: متخصص ژنتیک پزشکی، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
فاطمه طباطبائی: فوق تخصص غدد کودکان و متابولیسم، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
مرتضی هاشم‌زاده چالشتری: متخصص ژنتیک انسانی-مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران (* نویسنده مسئول) mchalesh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: دیابت شیرین گروهی از اختلالات متابولیک است که موجب افزایش سطح قند خون می‌شود. دیابت نوع یک (Type 1 Diabetes-T1D)، دیابت نوع دو (Type 2 Diabetes-T2D) و دیابت تک ژنی ۳ گروه اصلی دیابت هستند. دیابت بارز شده در بلوغ جوانان (Maturity Onset Diabetes of the Young-MODY) نوعی دیابت تک ژنی می باشد که معمولاً با T1D یا T2D اشتباه گرفته می‌شود و دارای ۱۴ زیر گروه مختلف است. هدف از این مطالعه، تشخیص MODY و تعیین فراوانی ۲ زیرگروه شایع‌تر آن در جمعیت دیابتی استان اصفهان است.

روش کار: در این مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی که با هدف تعیین نوع و فراوانی جهش‌های ۲ ژن *GCK* و *HNF1A* در ۲۶ خانواده‌ی مبتلا به دیابت نوع MODY در استان اصفهان انجام شد، از روش آنالیز پیوستگی ژنتیکی با انتخاب ۴ مارکر برای هر ژن استفاده شد. پیوسته بودن با تکنیک آنالیز قطعه تأیید و سپس اگزون‌های ژن مربوطه در خانواده‌های پیوسته به مارکرهای هر ژن توالی یابی شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از میان ۲۶ خانواده، ۴ خانواده به مارکرهای ژن *GCK* و ۳ خانواده به مارکرهای ژن *HNF1A* پیوسته بودند. پس از توالی یابی اگزون‌های این ۲ ژن در خانواده‌های مربوطه واریانت های یافت شده بررسی و اثر آن‌ها بر روی دیابت ارزیابی شدند. هیچ جهش بیماری زایی در این میان یافت نشد ولی تعدادی پلی‌مرفیسم با افزایش استعداد ابتلا به دیابت یافت شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه با وجود پیوسته بودن برخی خانواده‌ها برای مارکرهای ۲ ژن مورد نظر، علی رغم این که در مطالعات دیگرجهش در این ۲ ژن شایع‌ترین علل بروز MODY معرفی شده بودند، هیچ جهش بیماری‌زایی در هیچ‌یک از بیماران یافت نشد. بنابراین به نظر می‌رسد که پروفایل ژنتیکی در جمعیت مورد بررسی با پروفایل ژنتیکی جمعیت‌های مطالعه شده بسیار متفاوت است.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت کننده: دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

کلیدواژه‌ها
دیابت بارز شده در بلوغ جوانی (MODY)،
پیوستگی ژنتیکی،
مارکر STR،
ژن GCK،
ژن HNF1A

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۰۹
تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۲

شیوه استناد به این مقاله:
Sarmadi A, Tabatabaiefar MA, Tabatabaei F, Hashemzadeh Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of GCK and HNF1A genes in a group of families with MODY in Isfahan province of Iran. Razi J Med Sci. 2020;27(1):112-121.

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

Razi Journal of Medical Sciences.2020;27(1):112-121. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Genetic linkage analysis of GCK and HNF1A genes in a group of families with MODY in Isfahan province of Iran

Akram Sarmadi, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
Mohammad Amin Tabatabaiefar, PhD in Molecular Genetics, Department of Genetics and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Fatemeh Tabatabaei, Isfahan Endocrine and Metabolism Reaserch Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Morteza Hashemzadeh Chaleshtori, PhD in Human-Molecular Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran (*Corresponding author) mchalesh@yahoo.com

Abstract

Background: Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders resulting in increased level of blood sugar. Type 1 Diabetes (T1D), Type 2 Diabetes (T2D) and monogenic diabetes are there major groups of diabetes. Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a monogenic diabetes that is frequently mistaken for T1D or T2D and has 14 different subgroups. The aim of this study was to diagnose MODY and determine the frequency of its 2 major subgroups in Isfahan diabetic population.
Methods: The aim of this descriptive-experimental study was determining the type and frequency of mutations in GCK and HNF1A genes in 26 families with MODY from Isfahan using genetic linkage analysis method and selection of 4 markers for each gene. Linkage result was confirmed by fragment analysis and all the exons of genes were sequenced in any of the linked families.
Results: In this study from 26 families, 4 families were linked to markers of GCK gene and 3 families were linked to HNF1A gene. After sequencing of all exons of these 2 genes in the related families, variants were analyzed and their effects on diabetes were surveyed. There was no pathogenic mutation but some polymorphisms with increasing effects on susceptibility to diabetes were found.
Conclusion: In this study despite of the fact that some families were linked to markers of these 2 genes, and the results of other studies that showed mutations in these 2 genes are the frequent reasons of MODY, there were no pathogenic variants in any of the patients. So it seems that the genetic profile of this population is different from other studied populations.

Conflicts of interest: None
Funding: Shahrekord University of Medical Sciences

Keywords
Maturity Onset Diabetes of the Youngs (MODY),
Genetic linkage,
STR marker,
GCK gene,
HNF1A gene

Received: 31/08/2019
Accepted: 01/02/2020

Cite this article as:
Sarmadi A, Tabatabaiefar MA, Tabatabaei F, Hashemzadeh Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of GCK and HNF1A genes in a group of families with MODY in Isfahan province of Iran. Razi J Med Sci. 2020;27(1):112-121.

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

مقدمه

دیابت یا بیماری قند (Diabetes) یک اختلال سوخت و سازی (متابولیک) در بدن است که در آن میزان قند خون افزایش می‌یابد (۱). در این بیماری توانایی تولید هورمون انسولین در بدن از بین می‌رود و یا بدن در برابر انسولین مقاوم شده و بنابراین انسولین تولیدی نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را انجام دهد (۲). نقش اصلی انسولین پایین آوردن قند خون توسط سازوکارهای مختلف است. انسولین با اثر بر سلول‌های کبد باعث می‌شود این سلول‌ها با گرفتن قند از خون و ذخیره‌ی آن به صورت گلیکوژن، قند خون را کاهش دهند و با تجمع گلیکوژن در سلول‌های ماهیچه‌ای به عنوان یک منبع سوخت، انرژی را افزایش دهد (۳). همچنین با اثر به بافت‌های چربی، استفاده از چربی به عنوان منبع سوخت را متوقف می‌کند. در صورت نبود یا کمبود انسولین در خون، بدن از چربی به عنوان منبع سوخت استفاده می‌کند. انسولین به عنوان مرکز کنترل متابولیسم بدن عمل می‌کند (۴). دیابت سه نوع اصلی دارد: دیابت نوع یک (Type 1 Diabetes-T1D)، که با فقدان انسولین به علل خود ایمنی یا ایدیوپاتیک همراه است. در این نوع دیابت، تخریب سلول‌های بتا در پانکراس منجر به نقص تولید انسولین می‌شود (۵). در دیابت نوع دو (Type 2 Diabetes-T2D)، مقاوت پیشرونده بدن به انسولین وجود دارد که در نهایت ممکن است به تخریب سلول‌های بتای پانکراس و نقص کامل تولید انسولین منجر شود. در T2D مشخص است که عوامل ژنتیکی، چاقی و کم‌تحرکی، نقش مهمی در ابتلای فرد دارند (۳و ۶). نوع سوم دیابت، دیابت تک‌ژنی می‌باشد. نوع تک‌ژنی دیابت، گروه ناهمگونی (هتروژن) از دیابتی‌ها را تشکیل می‌دهد که توسط یک جهش ژنتیکی خاص ایجاد می‌شوند و با اختلال ترشح انسولین مشخص می‌شوند (۷). شایع‌ترین نوع دیابت تک‌ژنی معمولاً با بروز افزایش قند در سنین پایین (زیر ۲۵ سال) مشخص می‌شود که دیابت بارز شده در بلوغ جوانان (Maturity Onset Diabetes of the Young-MODY) نامیده می‌شوند (۸). براساس ژن جهش یافته تاکنون ۱۴ زیرگروه مختلف برای MODY معرفی شده است (۹). طبق مطالعات پیشین از میان این ۱۴ زیرگروه، فراوانی زیرگروه ۲ (MODY2-GCK) و زیرگروه ۳ (MODY3-HNF1A) بیش از سایرین گزارش شده است (۱۰و ۱۱).هرچند تخمین زده می‌شود که تنها ۲ تا ۵ درصد تمام انواع دیابت ناشی از این جهش‌ها است، تشخیص دقیق، اهمیت زیادی در درمان، پروگنوز و تعیین ریسک راجعه در افراد خانواده و طایفه دارد و از طریق مشاوره ژنتیک و تشخیص قبل از لانه گزینی (Preimplantation Genetic diagnosis-PGD) ، می‌تواند به پیشگیری از ابتلای فرزندان بیمار در خانواده‌های مبتلا بینجامد.

بیماران مبتلا به MODY، معمولاً در ابتدا وضعیت ملایم‌تری نسبت به بیماران مبتلا به T1D دارند ولی در برخی از آن‌ها علائم بیماری از همان ابتدای بروز شدید و مشابه T1D است (۱۲). از طرفی به دلیل بروز دیابت در سنین پایین و کمتر از ۲۵ سالگی، معمولا این بیماران را تحت عنوان T1D معرفی می‌کنند. این امر نه تنها ممکن است منجر به ارائه‌ی درمان‌های نامناسب برای این بیماران شود (۱۳). همچنین، خطر ابتلای سایر افراد خانواده را نادیده بگیرد. T1D، یک بیماری تک گیر بوده و معمولاً ارثی نیست. بنابراین در خانواده-ی فرد مبتلا معمولاً هیچ فرد بیمار دیگری مشاهده نمی‌شود و احتمال اینکه فرزندان وی به T1D مبتلا شوند بسیار کم است. در حالی‌که بیماران مبتلا به MODY دارای یک احتمال ۵۰ درصدی برای داشتن فرزند مبتلا به دیابت هستند و علت آن الگوی وراثتی آن است که به صورت غالب اتوزومی به ارث می‌رسد (۱۰). بنابراین تشخیص دقیق نوع دیابت در افراد دیابتی بسیار مهم است. در پژوهش حاصل بررسی پیوستگی ژنتیکی در ۲ ژن GCK و HNF1A در خانواده‌های دیابتی است که نوع دیابت آن‌ها براساس مارکرهای بیوشیمایی، (آنتی‌بادی های پانکراس و پپتید C (۱۴و ۱۵)، MODY تشخیص داده شده است.

روش کار

مطالعه‌ی توصیفی- آزمایشگاهی حاضر با کد اخلاق IR.Skums.REC.1394.196 در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به تصویب رسیده است. در این مطالعه ۲۶ خانواده مبتلا به دیابت که حداقل در ۳ نسل دیابت را در سنین زیر ۲۵ سال بروز داده‌اند و براساس آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام داده دارای سطح منفی آنتی بادی‌های پانکراس (آنتی گد۶۵ و آنتی انسولین II) و سطح قابل تشخیص پپتید C بودند جهت انجام آنالیز پیوستگی ژنتیکی انتخاب شدند. از افراد رضایت‌نامه‌ی کتبی جهت همکاری در طرح و پرسش‌نامه‌ای حاوی اطلاعات مربوط به بیماری تهیه گردید. از بیماران و سایر افراد خانواده ۵ میلی لیتر خون محیطی در لوله‌ی حاوی EDTA ۰,۵ مولار اخذ گردید و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. استخراج DNA با استفاده از روش استاندارد فنل و کلروفرم انجام شد.

جهت بررسی ارتباط دیابت با ۲ ژن GCK و HNF1A، نشانگرهای STR (Short Tandem Repeat) مربوط به این ۲ ژن شناسایی و پرایمر مناسب برای آن‌ها طراحی و آماده گردید. این نشانگرها دارای واحدهای تکراری ۲ نوکلئوتیدی بودند و معیار انتخاب آن‌ها درجه‌ی چندشکلی، فاصله از ژن، هتروزیگوت بودن و طول محصول PCR آن‌ها بود. درجه‌ی چندشکلی به این معنا که هرچه نشانگر دارای درجه‌ی چندشکلی (Polymorphism) بالاتری باشد، ارزش بالاتری برای بررسی دارد. همچنین مارکرهایی که موقعیت فیزیکی آن‌ها درون ژن باشد در اولویت انتخاب هستند و در صورت عدم دسترسی، بهتر است مارکرهایی با کمترین فاصله از ژن انتخاب شوند زیرا احتماً وقوع نوترکیبی در فواصل کمتر، پایین‌تر می‌باشد. به سبب بررسی آسان تر مارکرها روی ژل پلی‌آکریل‌آمید، مناسب تر است که طول آن‌ها کوتاه باشد تا محصول PCR آن‌ها باندهای کوتاه تری بدهد و تفکیک آلل‌ها راحت‌تر صورت گیرد. مناسب‌ترین مارکرها طولی در محدوده‌ی ۱۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز دارند. انتخاب این نشانگرها از طریق پایگاه داده‌ی NCBI Genome Browser و MAP Viewer انجام شد. در جدول ۱ نام و مشخصات این نشانگرها آورده شده است.

پس از آماده شدن پرایمرها، برای هر مارکر و برای هر فرد واکنش PCR انجام شد. جهت اختصاصیت بیشتر واکنش از روش Touchdown PCR استفاده شد. به این صورت که ابتدا در چند سیکل دمای اتصال پرایمرها از چند درجه بالاتر از دمای مناسب شروع می‌شود و هر سیکلی دما یک درجه کاهش می‌یابد و پس از رسیدن به دمای مناسب مابقی سیکل‌ها تا انتها در همان دما انجام می‌گیرد. این امر موجب می‌شود پرایمر به صورت

جدول ۱- نام و مشخصات نشانگرهای انتخاب شده برای ۲ ژن GCK و HNF1A

لوکوس	نام نشانگر	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	طول‌محصول PCR (bp) جفت باز	توالی پرایمر
GCK	D7S2428	۵۳	۱۸۵	F:GCTCTGGGAGCAAGGAC R:TATGAGGCCCTGGGTG
	GCK	۵۸	۱۹۵	F: CCCACACCAAAACTGCCTGTATT R:TTGGTCAGTGTAGGCTGAACTTG
	D7S621	۴۹	۲۸۲	F:GATTCTGATAACCTTCACAGA R:AGGATGATTCCATCTTAATAC
	D7S478	۵۵	۱۵۰	F:TGTGTCATTACGCTTTTCATC R:TCAAATGGTTCAGGAGAAAGA
HNF1A	D12S1720	۶۲	۱۱۷	F:GCTGATTAGGACAGGCACAC R:CATCCATGTGGCATGTG
	D12S86	۶۴	۱۳۴	F:AGCTAGTCTGGCATGAGCAG R:CTATCCCCTGATGATCTCCC
	D12S1721	۵۰	۲۸۵	F:AGTCCCTGATAACCCTGG R:CGCATACAGCCCTTTG
	D12S1349	۵۸	۱۵۰	F:CCCAAGAGTGACATTGGC R:GCATGGCTGGAGCATAAG

جدول ۲- پرایمرهای طراحی شده برای همه‌ی اگزون‌های ۲ ژن *GCK* و *HNF1A*

شماره اگزون	GCK	طول محصول PCR (bp) جفت باز	شماره اگزون	HNF1A	طول محصول PCR(bp) جفت باز
۱	F:CTGAGGCCACTCCTGGTC R:TCTGAGGCTCAAACAAACC	۶۸۶	۱	F:TGCAAGGAGTTTGGTTTGTG R:GAAGGTCATGGGGACTCAAC	۵۳۶
۲	F:CCCATGTTCACAGAGTGTGG R:CCCCAGCCTTAGTTTTGGTA	۴۵۸	۲	F:CCTCAGGGTTGACAAGGTTC R:TGTGTAATGGGGATGGTGAA	۳۹۵
۳	F:GTGTGCAGATGCCTGGTG R:CTGGCTGTGAGTCTGGGAGT	۳۴۶	۳	F:GCCATGGCAATGAGAAAGAA R:GGCAACTGGACAGCCTTTTA	۳۸۷
۴	F:CCTTCCCTCCTCCTCTTTGT R:CCACCCCTGGTAGACAGGT	۳۶۴	۴	F:GGCAGAGCTCAGCTTCTCAG R:AAGGAGTGGCATGAATGGAA	۴۶۴
۵	F:CGGAAGAGGAGAGGGAAACT R:CTCCCTTCTGAGCACATGGT	۳۷۶	۵	F:GCCTAAGCAAACCAATGGAG R:CAGCTGCTGAGACCTACGAG	۳۹۱
۶و۷	F:TGCATACTTTTATGGCCCTGT R:TTTGGTCCTCACCCCACA	۴۹۲	۶	F:CCAACCTCATCTTTCCTTGG R:AATGAATGAATGAGTCCCAGTG	۴۰۰
۸	F:CCATTGTTCCAGACAAAGCA R:CAAGCCCATTATCTGCAATG	۴۰۰	۷	F:CTCTGGGAAGGAGAGGTGGT R:GTCCCAGAGACACATGCAGA	۳۹۷
۹	F:GACCTCAGTGGGGAGCAGT R:AGGCCCTAGTTTCCCATCC	۳۷۶	۸	F:TTTTGAAAATCAGCCCTGGA R:CTGGAGGCCTCAGTGTCTG	۳۸۹
۱۰	F:CCTCCCTGGAGAACGAGAG R:AATCTTGGAGCTTGGGAACC	۴۱۰	۹	F:ACCAAGCAGGTAAGGTCCAG R:CTTCCTCACAGCAGCCCTA	۳۷۵
۱۱	F:TGAATGTGGAGGATGAGGTG R:GAGCCTCAGGCAAGAAAATG	۷۱۲	۱۰	F:TGAGTACCCCTAGGGACAGG R:CCTGCCTTCCCTGTTAGCTT	۶۴۰

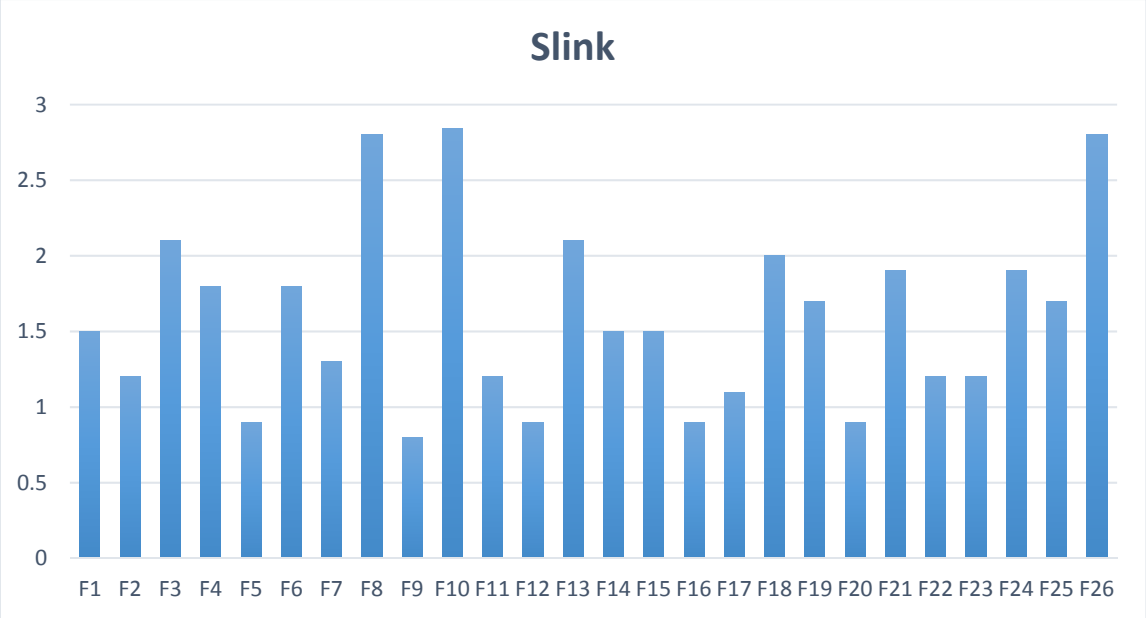
اختصاصی‌تر متصل شوند.

پس از انجام PCR، محصولات آن بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲-۱۰٪ و با جریان ۱۵ میلی آمپر الکتروفورز شد و با شیوه‌ی نیترات نقره رنگ آمیزی شد. سپس تعیین ژنوتایپ برای هر مارکر در هر خانواده صورت گرفت. برای محاسبه‌ی Slink از FastSlink version 2.51 و برای تعیین LOD score پارامتری از Superlink version 1.6 استفاده شد. پس از آلل بندی مارکرها در هر فرد بر روی ژل برای رسم هاپلوتایپ و تعیین پیوسته بودن خانواده‌ها از نرم افزار Haplopainter version 2.95 استفاده شد و خانواده‌های پیوسته به مارکرهای هر ژن مشخص شدند. برای خانواده‌هایی که پیوستگی نشان دادند برای تأیید بیشتر برای همان مارکرهای آنالیز قطعه (Fragment Analysis) انجام شد. به دلیل این‌که الگوی توارث این بیماری اتوزومی غالب است، نتایج پیوستگی بر روی ژل لازم بود توسط این تکنیک ارزیابی و تأیید شود. در این تکنیک همان پرایمرهای مربوط به مارک ها استفاده شد، با این تفاوت که پرایمر پیشرو (Forward) با یک مارکر فلورسنت نشاندار شده است. نتایج آنالیز قطعه که با نرم افزار Peak scanner_v1.0 انجام شد طول دقیق هر آلل در هر مارکر را برای هر فرد به صورت جفت باز (Base pair) نشان می‌دهد. بنابراین از طریق آن نتایج آلل‌بندی تأیید یا رد می‌شوند. در نهایت اگزون‌های ژن مربوط در یک فرد بیمار از هر خانواده که پیوستگی را نشان دادند توالی یابی شد. در جدول ۲ پرایمرهای مورد استفاده برای هر اگزون از ۲ ژن مورد بررسی آورده شده است.

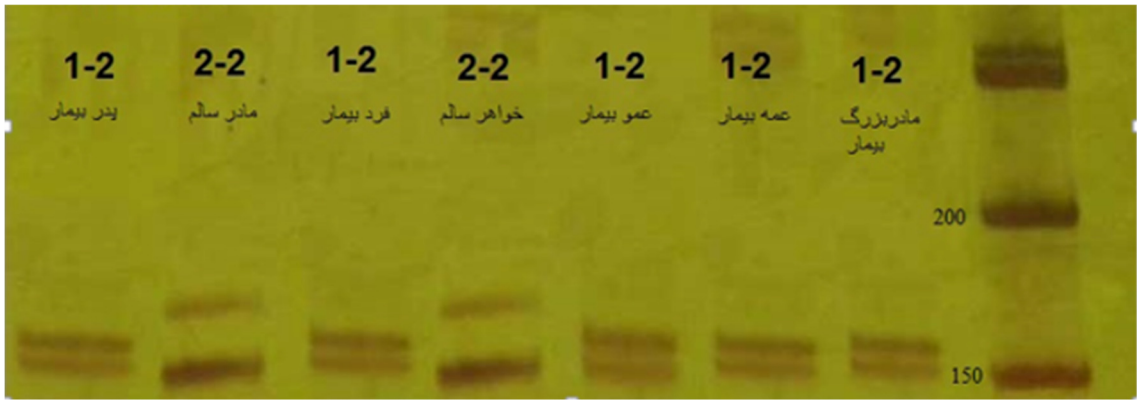
یافته‌ها

از میان تعداد حدود ۴۰ خانواده که معیارهای بالینی مشکوک به MODY داشتند، پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، ۲۶ خانواده با احتمال بالا مبتلا به MODY تشخیص داده شدند. این افراد سطوح منفی برای آنتی‌بادی‌های پانکراس و سطح قابل تشخیص پپتیدC داشتند. پس از بررسی ارزش Slink در این خانواده‌ها، میزان آن که شاخصی است برای ارزیابی قدرت محاسباتی خانواده در آنالیزهای پیوستگی، خانواده‌ها دارای حداقل و حداکثر به ترتیب ۰/۸ و ۲/۸۴ بود (نمودار ۱).

تعیین ژنوتیپ بر روی ژل برای همه‌ها خانواده‌ها ۲ یا بیشتر تکرار شد و سپس در خانواده‌هایی که پیوستگی به مارکرهای یک ژن را نشان دادند طول دقیق هر آلل توسط آنالیز قطعه مشخص شد و نتایج آلل بندی بر



نمودار ۱– ارزش Slink مربوط به ۲۶ خانواده‌ی مورد بررسی (محور افقی خانواده‌ها و محور عمودی میزان Slink را نشان می‌دهد).



شکل ۱– تصویری از یکی از ژل‌های نشان دهنده‌ی پیوستگی برای خانواده‌ی F8

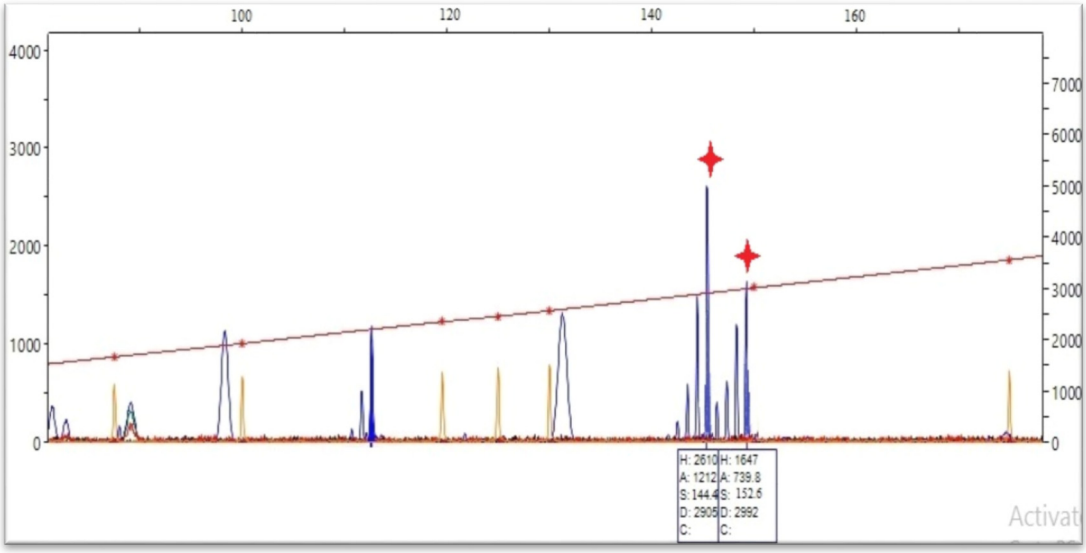
همان طور که در تصویر مشاهده می‌شود، مارکر D7S478 با طول باند حدود ۱۵۰ bpr ، در افراد بیمار این خانواده به صورت هتروزیگوت و دارای دو آلل ۱و۲ هستند، در حالی که افراد سالم به صورت هموزیگوت و تنها دارای آلل۲ هستند. پس آلل ۱ در این خانواده آلل بیماری‌زا محسوب می‌شود.

روی ژل، توسط این تکنیک تأیید شد. در شکل ۱ نمونه‌ای از تعیین ژنوتیپ بر روی ژل در یکی از خانواده‌ها نشان داده شده است. شکل ۲ نتایج آنالیز قطعه برای پدر بیمار همین خانواده و برای همین مارکر (D7S478) را نشان می‌دهد. در نهایت هاپلوتایپ رسم شده برای این خانواده برای هر ۴ مارکر لوکوس حاوی ژن GCK در شکل ۳ نشان داده شده است.

بر اساس این نتایج ۴ خانواده به مارکرهای ژن GCK و ۳ خانواده به مارکرهای ژن HNF1A پیوسته تشخیص داده شدند. بنابراین توالی یابی با استفاده از پرایمرهای مناسب در یک فرد بیمار برای اگزون‌های هر ژن انجام شد.

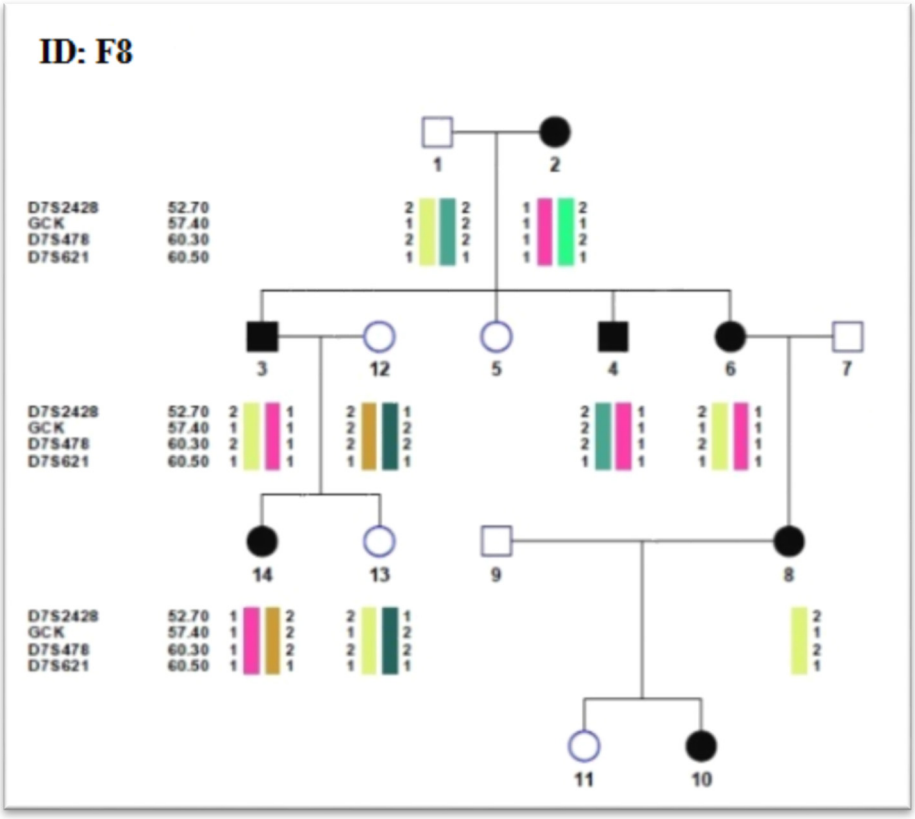
نتایج توالی‌یابی بررسی و در نهایت۳ واریانت برای ژن GCK و ۱۰ واریانت برای ژن HNF1A یافت شدکه در جدول ۳ لیست شده اند. واریانت‌هایی که از قبل گزارش شده بودند، در پایگاه‌های داده به صورت in silico و واریانت‌های گزارش نشده، با استفاده از نرم‌افزارهای پیش بینی کننده به صورت in silico، مورد بررسی قرار گرفتند و ارتباط احتمالی آن‌ها با بیماری دیابت بررسی شد. در این مطالعه هیچ واریانت بیماری‌زایی یافت نشد ولی ارتباط برخی از این واریانت‌ها با دیابت تأیید شد. بنابراین برخی از این پلی

مرفیسم‌ها نقش در ایجاد استعداد خانوادگی بـه دیابـت داشتند.



شکل ۲– نتیجه‌ی آنالیز قطعه مربوط به فرد شماره ۱ (پدربیمار) در خانواده‌ی F8.

در این تصویر که مربوط به مارکر D7S478 برای فرد شماره ۱ (پدر بیمار) در خانواده‌ی شماره ۸ می‌باشد، تفکیک دقیق دو آلل با طـول بانـدهای bp ۱۴۴ و ۱۵۲ به طور واضح مشخص است و این تفکیک در ژل نیز به طور واضحی مشاهده شده بود.



شکل ۳– هاپلوتایپ مربوط به خانواده‌ی F8 پیوسته به مارکرهای ژن *GCK*

در تصویر هاپلوتایپ فوق، افراد بیمار به هاپلوتایپ ۱-۱-۱-۱ پیوسته بودند و این هاپلوتایپ در افراد سالم مشاهده نمی‌شـود. ترتیـب مارکرهـا براسـاس نقشـه‌ی مارشفیلد می‌باشد.

جدول ۳- واریانت‌های یافت شده در ژن های *GCK* و *HNF1A*

ژن	ردیف	شماره‌نمونه	شماره اگزون	نام‌گذاری‌واریانت	شماره SNP	توصیف اثر واریانت
GCK	۱	F16	1	c.387C>G	rs13306391	غیر بیماری زا- ناحیه‌ی 5'utr
	۲	F8 F19	6&7	g.48449T>C	rs2268574	غیر بیماری زا- ناحیه‌ی اینترون
	۳	F8	10	g.52682C>T	rs2908274	غیر بیماری زا- ناحیه‌ی اینترون
HNF1A	۱	F9	1	c.277C>G	rs1169289	ناحیه‌ی کدکننده- واریانت هم معنی
	۲	F9	1	c.305A>C	rs1169288	ناحیه‌ی کدکننده- واریانت بد معنی- غیربیماری زا
	۳	F17 F22	1	c.277C>G	rs22685289	ناحیه‌ی کدکننده- واریانت هم معنی
	۴	F22	1	c.305A>C	rs2909288	ناحیه‌ی کدکننده- واریانت بد معنی- غیربیماری زا
	۵	F9 F17 F22	3	g.14955C>T	rs1169301	غیر بیماری زا- ناحیه‌ی اینترون
	۶	F9 F17 F22	4	c.1090G>C	rs56348580	ناحیه‌ی کدکننده- واریانت هم معنی
	۷	F9 F17 F22	8&9	g.20876T>C	rs1169304	ناحیه‌ی اینترون- واریانت بد معنی- غیربیماری زا
	۸	F17 F22	8&9	c.1771G>A	rs55834942	ناحیه‌ی کدکننده- واریانت هم معنی
	۹	F9	10	c.2560G>A	rs1169310	ناحیه‌ی کدکننده- واریانت هم معنی
	۱۰	F9 F22	10	c.2319G>T	rs1169309	ناحیه‌ی کدکننده- واریانت هم معنی

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر با افزایش رو به رشد بروز دیابت در تمام جوامع رو به رو هستیم و با توجه به اینکه تاکنون درمان قطعی برای این بیماری ارائه نشده است و تقریباً در تمام بیماران تنها راه درمان، کنترل وضعیت بیماری، و تلاش برای کاهش عوارض آتی آن می‌باشد، پیش‌گیری از ابتلا به دیابت یک راه بسیار مناسب برای کاهش فراوانی این بیماری است. بیماران مبتلا به MODY کمتر از ۵٪ جمعیت بیماران دیابتی را تشکیل می‌دهند (۱۰). با توجه به اینکه تاکنون در جمعیت ایران، مطالعات زیادی بر روی بیماران مبتلا به MODY به صورت گسترده انجام نشده، بنابراین گزارش صحیحی از درصد و میزان مبتلایان به دیابت MODY و انواع زیرگروه‌های آن در جمعیت ایران در دسترس نیست. جهش در دو ژن GCK و HNF1A دارای بیشترین فراوانی و مهم‌ترین عامل بروز دیابت MODY در جهان می‌باشد (۱۶و ۱۷). بنابراین در این مطالعه نیز این دو ژن انتخاب شدند. در مطالعه‌ی حاضر از میان ۲۶ خانواده‌ی بررسی شده، ۴ خانواده به مارکرهای ژن GCK و ۳ خانواده به مارکرهای ژن HNF1A پیوسته بودند. پس از توالی‌یابی تمام اگزون‌های این دو ژن مجموعا ۱۶ واریانت یافت شد. از میان این ۱۶ واریانت، ۱۳ واریانت، از قبل گزارش شده بودند و ارتباط برخی از این واریانت‌ها با دیابت در مطالعات قبلی ثابت شده بود که شامل دیابت بارداری، دیابت تیپ دو و MODY بودند. همچنین، ۳ واریانت گزارش نشده نیز یافت شد که طبق بررسی‌های Insilico، این ۳ واریانت غیر بیماری‌زا پیش‌بینی شدند. بنابراین در جمعیت مورد مطالعه، هیچ جهش بیماری‌زایی که به طور مستقیم بتواند سبب بروز MODY شود یافت نشد.

فراوانی زیر گروه‌های مختلف MODY، در جمعیت‌های مختلف دنیا متفاوت است. با توجه به اینکه جمعیت ایران تاکنون از نظر این بیماری و فراوانی جهش‌های انواع ژن‌های درگیر در آن، مورد بررسی قرار نگرفته‌اند، بنابراین نمی‌توان گفت که قطعاً در این جمعیت هم این دو ژن، عامل اصلی بروز MODY هستند و امکان اینکه در این جمعیت فراوانی انواع زیر

گروه‌های MODY با دیگر جمعیت‌های دنیا متفاوت باشد، وجود دارد. طبق مطالعه‌ای که توسط نیونت و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، گزارش شد که ۲۰-۱۵٪ مواردی که از نظر علائم بالینی و مارکرهای بیوشیمیایی مشابه MODY هستند، فاقد هرگونه جهش یا واریانت بیماری زایی در هریک از ۱۳ ژن شناخته شده برای MODY هستند (در زمان انجام این مطالعه، هنوز زیرگروه ۱۴ برای این بیماری معرفی نشده بود). این گروه از بیماران که آن‌ها را MODYX می‌نامند، احتمالاً در ژن‌های دیگری دارای جهش هستند که تاکنون بررسی نشده است (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ بر روی جمعیت ایرانی مبتلا به MODY و با هدف تعیین فراوانی جهش‌های ژن HNF1A انجام شد، از میان ۳۴ خانواده‌ی مبتلا به دیابت MODY (تأیید شده بر اساس مارکرهای بیوشیمیایی)، فقط در یک خانواده، جهش در این ژن یافت شد که معادل ۲٪ جمعیت مورد بررسی و بسیار کمتر از فراوانی آن در جهان است (۱۹). بنابراین تفاوت در فراوانی جهش‌های موجود در ژن‌های مختلف در بیماری‌های مختلف دیده می‌شود و تنها راه مورد اطمینان برای یافتن علت اصلی بیماری، توالی‌یابی کل ژنوم (یا کل اگزوم) است. البته می‌توان از طریق انجام توالی‌یابی توسط پنل‌هایی که پوشش دهنده‌ی مجموعه‌ی کل ژن‌هایی است که سبب ایجاد همه‌ی انواع دیابت می‌شود (شامل T1D، T2D، انواع دیابت تک‌ژنی و دیابت‌های سندرومی) از عدم وجود جهش در هریک از این ژن‌ها اطمینان خاطر کسب کرد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ بر روی ۷۶ بیمار مبتلا به دیابت با علائم دیابت تک‌ژنی (۳۲ نفر با علائم دیابت نوزادی و ۴۴ نفر با علائم MODY) انجام شد، از یک پنل پوشاننده‌ی ۳۶ ژن دخیل در دیابت نوزادی و MODY استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از میان ۳۲ نفر، ۷ نفر آن‌ها (۲۲٪) دارای جهش در ژن‌های مربوط به دیابت نوزادی، و ۱۲ نفر از ۴۴ نفر (۲۷٪) دارای جهش در ژن‌های MODY بودند. بنابراین تنها در ۱۹ نفر از میان ۷۶ نفر جهش ایجاد کننده‌ی بیماری توسط این پنل شناسایی شد. پس، ژن‌های دیگری نیز وجود دارند که هنوز شناسایی نشده‌اند (۲۰). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ انجام شد، برای دو خانواده‌ی دارای علائم MODY که در غربالگری اولیه برای ژن‌های HNF4A، GCK و HNF1A فاقد جهش بودند، توالی‌یابی اگزوم انجام شد. در یکی از این بیماران جهش در ژن HNF1B یافت شد. در بیمار دیگر، یک جهش در ژن HNF1A یافت شد که در توالی‌یابی سنگر تشخیص داده نشده بود. پس از بررسی‌های ژنتیکی مشخص شد که پرایمر Reverse استفاده شده برای توالی‌یابی ، دارای یک پلی-مرفیسم تک نوکلئوتید (SNP) بود که این SNP سبب شده بود که فقط رشته‌ی DNA دارای آلل وحشی (غیر جهش یافته) تکثیر یافته و توالی‌یابی شده بود (۲۱).

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان چنین نتیجه گرفت که برخلاف گزارش‌های موجود بر روی فراوانی انواع زیرگروه‌های MODY، در جمعیت مبتلایان استان اصفهان، دو ژن GCK و HNF1A تأثیر زیادی در بروز MODY نداشته و دارای نرخ بالایی از جهش نیستند و دلیل آن هم تفاوت در نیم رخ ژنتیکی این جمعیت با سایر جمعیت‌های گزارش شده در جهان می‌باشد. همچنین علاوه بر وجود جهش‌های بیماری-زایی که به طور مستقیم می‌توانند سبب بروز دیابت شوند، تعداد زیادی واریانت ژنتیکی وجود دارد که سبب افزایش استعداد بروز دیابت می‌شود و به دلیل به ارث رسیدن این واریانت‌ها، احتمال مشاهده‌ی دیابت خانوادگی (Familial Diabetes) در افراد حامل آن‌ها وجود دارد.

تقدیر و تشکر

از تمامی بیماران و خانواده‌های عزیز آن‌ها که با وجود رنج بیماری قبول همکاری با این طرح را کردند تشکر ویژه دارم و از خداوند سلامتی آن‌ها را خواستارم. نتایج این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد ۲۵۹۶-۰۷-۰۱-۱۳۹۴ که در تاریخ ۱۳۹۵/۵/۲۸ به تصویب رسید، می‌باشد. از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، پژوهشکده علوم پایه سلامت و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه تشکر می‌کنم. همچنین از مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در راستای معرفی بیماران و ارائه ی مشاوره ی بالینی توسط متخصصین محترم این مرکز نهایت تشکر را دارم.

References

1. Siddiqui K, Musambil M, Nazir N. Maturity onset diabetes of the young (MODY)—History, first case reports and recent advances. Gene. 2015;555(1):66-71.

2. Kuzuya N. Report from the Committee of the Criteria for the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Diabetes. 1970;13:1-8.

3. Malecki MT, Klupa T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. Pharmacol Rep. 2005;57:20.

4. Aggarwal SR. What's fueling the biotech engine—2011 to 2012. Nat Biotechnol. 2012;30(12):1191.

5. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet. 2001;358(9277):221-9.

6. Ahmad SI. Obesity and diabetes. Obesity: Springer; 2016. p. 117-30.

7. Kherra S, Blouin JL, Santoni F, Schwitzgebel Luscher V. Precision medicine for monogenic diabetes: from a survey to the development of a next-generation diagnostic panel. Swiss Med Wkly. 2017; 147:14535.

8. Anık A, Çatlı G, Abacı A, Böber E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. J Pediatr Endocrinol Metab. 2015;28(3-4):251-63.

9. Radha V, Mohan V. Genetic basis of monogenic diabetes. Curr Sci. 2017;113(7):1277.

10. Chapla A, Mruthyunjaya MD, Asha HS, Varghese D, Varshney M, Vasan SK, et al. Maturity onset diabetes of the young in India–a distinctive mutation pattern identified through targeted next-generation sequencing. Clin Endocrinol. 2015;82(4):533-42.

11. Ming-Qiang Z, Yang-Li D, Ke H, Wei W, Jun-Fen F, Chao-Chun Z, et al. Maturity onset diabetes of the young (MODY) in Chinese children: genes and clinical phenotypes. J Pediatr Endocrinol Metab. 2019 Jul 26;32(7):759-765.

12. Chen N, Unnikrishnan R, Anjana RM, Mohan V, Pitchumoni CS. The complex exocrine–endocrine relationship and secondary diabetes in exocrine pancreatic disorders. J Clin Gastroenterol. 2011;45(10):850-61.

13. Gardner DS, Tai ES. Clinical features and treatment of maturity onset diabetes of the young (MODY). Diabetes Metab Syndr Obes. 2012;5:101-8.

14. Ewald N, Bretzel RG. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (Type 3c)—are we neglecting an important disease? Eur J Intern Med. 2013;24(3):203-6.

15. Sarmadi A, Tabatabiefar MA, Tabatabaei F, Gholizadeh A, Chaleshtori H. Use of non-genetic biomarkers including anti-GAD65, anti-Insulin (II) and C-peptide in differentiating MODY type diabetes in a population of diabetic patients in Isfahan province. J Shahrekord Uni Med Sci. 2018;20(2).

16. Nyunt O, Wu JY, McGown IN, Harris M , Huynh T, Leong GM, et al. Investigating maturity onset diabetes of the young. Clin Biochem Rev. 2009;30(2):67.

17. Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, Dabelea D, Davis C, Dolan LM, et al. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(10):4055-62.

18. Gonsorčíková L, Průhová Š, Cinek O, Ek J, Pelikánová T, Jørgensen T, et al. Autosomal inheritance of diabetes in two families characterized by obesity and a novel H241Q mutation in NEUROD1. Pediatr Diabetes. 2008;9(4pt2):367-72.

19. Moghbeli M, Naghibzadeh B, Ghahraman M, Fatemi S, Taghavi M, Vakili R, et al. Mutations in HNF1A gene are not a common cause of familial young-onset diabetes in Iran. Indian J Clin Biochem. 2018;33(1):91-5.

20. Alkorta-Aranburu G, Carmody D, Cheng Y, Nelakuditi V, Ma L, Dickens JT, et al. Phenotypic heterogeneity in monogenic diabetes: the clinical and diagnostic utility of a gene panel-based next-generation sequencing approach. Mol Genet Metab. 2014;113(4):315-20.

21. Dusatkova P, Fang M, Pruhova S, Gjesing AP, Cinek O, Hansen T, et al. Lessons from whole-exome sequencing in MODYX families. Diabetes Res Clin Pract. 2014;104(3):e72-e4.