



بررسی پلی مورفیسم rs7903146 در ژن TCF7L2 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲

فهیمة ساعی فر: گروه مامایی، مرکز بهداشت مراغه، مراغه، آذربایجان شرقی، ایران؛ گروه ژنتیک، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، آذربایجان شرقی، ایران
سالار مومن مراغه: گروه بیوتکنولوژی (BRC)، انستیتو پاستور ایران؛ گروه بیوتکنولوژی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
الهام قاندى: گروه پزشکی، دانشگاه ملی تحقیقات پزشکی پیروگوف، مسکو، روسیه
سید محمد متین خادمی: گروه دارو، بیمارستان امام حسین علیه السلام، مشهد، ایران
سعید دبیری فر: گروه رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

حسین سلطانزاده: گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مراغه، آذربایجان شرقی؛ گروه ژنتیک، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، آذربایجان شرقی، ایران (* نویسنده مسئول)
Hossein4040@gmail.com

چکیده

کلیدواژه‌ها

پلی مورفیسم،
rs7903146،
TCF7L2،
دیابت نوع ۲.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۴
تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷

زمینه و هدف: پلی مورفیسم rs7903146 در ژن TCF7L2 شایع‌ترین پلی مورفیسمی مرتبط با دیابت نوع ۲ است؛ بنابراین هدف از این مطالعه بررسی همراهی پلی مورفیسم rs7903146 در ژن TCF7L2 با دیابت نوع دو در جمعیت استان آذربایجان شرقی بود.
روش کار: تعداد ۱۰۱ نمونه خونی از افراد بیمار مبتلا به دیابت و ۱۰۱ نمونه خونی از افراد سالم جمع‌آوری شد. بعد از استخراج DNA از تمامی نمونه‌ها و کیفیت سنجی نمونه‌ها با پرایمر اختصاصی، PCR و الکتروفورز انجام گرفت. در نهایت با آنزیم محدود کننده RsaI محصولات PCR، تیمار شده و دوباره الکتروفورز گردید و پلی مورفیسم هدف بررسی شد.
یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌ها به صورت $TT=33/7$ ، $CC=16/8$ و $CT=49/5$ (درصد) برای افراد سالم به دست آمد و در افراد بیمار نیز فراوانی ژنوتیپ‌ها به صورت $TT=43$ ، $CC=14$ و $TC=43$ (درصد) محاسبه گردید. درصد آلل T نیز در افراد سالم و بیمار به ترتیب ۴۲/۱ درصد و ۶۴/۵ درصد و درصد آلل C در افراد سالم و بیمار به ترتیب ۵۷/۹ درصد و ۳۵/۵ درصد گزارش شد.
نتیجه‌گیری: احتمالاً بین پلی مورفیسم rs7903146 در ژن TCF7L2 و ابتلا به دیابت ارتباط وجود داشته باشد. بنابراین با مطالعات بیشتر در این زمینه می‌توان به نتایج دقیق‌تر رسید و تشخیص احتمال ابتلا به دیابت را در جمعیت‌های مختلف بررسی کرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Saeifar F, Momen Maragheh S, Ghaedi E, Khademi SM, Dabirifar S, Soltanzade H. Investigation of rs7903146 Polymorphism in TCF7L2 Gene in Patients with Type 2 Diabetes. Razi J Med Sci. 2024(27 Jan);30.175.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.

Investigation of rs7903146 Polymorphism in TCF7L2 Gene in Patients with Type 2 Diabetes

Fahimeh Saeifar: Department of Midwifery, Health Center of Maragheh, Maragheh, East Azerbaijan, Iran; Department of Genetics, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, East Azerbaijan, Iran

Salar Momen Maragheh: Biotechnology Research Center (BRC), Pateur Institute of Iran, Tehran, Iran; Department of Biotechnology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Elham Ghaedi: Department of Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Sayed Mohammadmatin Khademi: Department of Pharmacology, Imam Hussain Hospital, Mashhad, Khorasan Razavi, Iran

Saeid Dabirifar: Department of Radiology, Faculty of Paramedicine, Ferdowsi University, Mashhad, Khorasan Razavi, Iran

Hossein Soltanzade: Department of Genetics, Maragheh University of Medical Science, Maragheh, East Azerbaijan, Iran; Department of Genetics, Islamic Azad University of Bonab, Bonab, East Azerbaijan, Iran (* Corresponding Author) Hossein4040@gmail.com

Abstract

Background & Aims: Diabetes as a heterogeneous disease is characterized by a decrease in insulin sensitivity and a defect in insulin secretion. In general, diabetes is divided into four groups, type 1 diabetes, type 2 diabetes, gestational diabetes, and diabetes of various causes. To be Emerging evidence suggests that common and rare genetic polymorphisms can influence the risk of diabetic complications. Type 2 diabetes is a heterogeneous group of disorders that is usually characterized by the inability of pancreatic beta cells to increase insulin secretion to compensate for insulin resistance in peripheral tissues. Type 2 diabetes has been diagnosed in adults and is related to obesity, lifestyle, age, family history, and genetics. Genetically, many gene polymorphisms are known to be associated with this disease. The cause of type 2 diabetes is a mixture of lifestyle and genetic factors, while a person can control some of these issues such as diet and obesity, other issues such as aging, being female, and genetics cannot be controlled. However, until now, the exact cause of this disease has not been determined and its prevalence rate is also increasing. In the last decade, the prevalence of this disease has increased alarmingly in Iran. The single nucleotide polymorphism 7903146rs is located in intron number 3 of the TCF7L2 gene, which is significantly associated with type 2 diabetes. The expression of TCF7L2 in pancreatic cells of type 2 diabetic patients compared to healthy individuals was reported to be accompanied by a decrease in insulin secretion. Apart from the effect of the TCF7L2 variant on cell structure and insulin release from the beta pancreas, several studies have also reported a decrease in insulin secretion in response to the increased expression of TCF7L2 in the pancreas. The TCF7L2 gene is a transcription factor involved in the Wnt signaling pathway, which plays an important role in the development of pancreatic islets and fat. The TCF7L2 gene is considered one of the most important candidate genes for T2DM and plays an important role in blood glucose homeostasis and function. It has beta cells. The rs7903146 variant is one of the most important variants that has been proven to be related to diabetes in other populations, but so far no study has been conducted in East Azerbaijan on the relationship between the role of TCF7L2 in the development of type 2 diabetes, so the present study aims to investigate the relationship between poly The Morphism of rs7903146 in the TCF7L2 gene was performed in patients with type 2 diabetes in East Azerbaijan.

Methods: 101 unrelated patients were invited to the diabetes clinic to provide blood

Keywords

Polymorphism,
rs7903146,
TCF7L2,
Type 2 Diabetes

Received: 05/08/2023

Published: 27/01/2024

samples. The basic information of the patients such as BMI, gender, and age was recorded in a questionnaire, and to comply with the ethical principles, a tracking code was inserted at the top of each questionnaire. Also, 101 unrelated healthy people were selected from the general population to call the control subjects. In this study, about 2 cc of blood samples were taken from each person and collected in tubes containing EDTA. The collected samples were transferred to the laboratory with a flask containing dry ice and kept at -20°C until extraction. The tubes containing the blood samples of patients and controls were numbered separately, and their gender was also noted on the tubes. After DNA extraction from all samples and quality assessment of the samples with specific primers, PCR and electrophoresis were performed. Took finally, the PCR products were treated with *RSal* restriction enzyme and electrophoresed again, and the target polymorphism was checked.

Results: The frequency of genotypes was found as TT=33.7, CC=16.8, and CT=49.5 (percentage) for healthy people and the frequency of genotypes in sick people was found as TT=43, CC=14, and TC=43. = (percentage) was calculated. The percentage of the T allele in healthy and sick people was reported as 42.1% and 64.5%, respectively, and the percentage of the C allele in healthy and sick people was reported as 57.9% and 35.5%, respectively.

Conclusion: Because today diabetes is spreading all over the world as an unprecedented epidemic and also considering the role of genetic factors in the development of type 2 diabetes, it is necessary to investigate the genes related to this disease. It seems in the present study, the results showed that the frequency of the C allele, which is the dominant allele, is 57.9% in the healthy group, and 35.5% in the patient group, which shows a 22% decrease, and the frequency of the T allele, which is the polymorphism allele. It is 42.1% in the healthy group and 64.5% in the patient group, which 22% increase in the patient group shows that there is probably a relationship between the increase of the T allele and the risk of type 2 diabetes and the risk. The incidence rate in the patient group is 2.501, and since it is more than one, there is a risk of contracting the disease, while the risk rate in the healthy group is 0.638, which is less than one. On the other hand, the frequency of genotypes was found as TT=33.7, CT=16.8, and CC=49.5 (percentage) for healthy people, and in sick people, the genotype frequency was as TT=43, CC=14, and TC = 43 (percentage) was calculated. The results of this study show that the types of polymorphisms are a factor for genetic diversity and determine the phenotypic diversity between people, and it may affect the susceptibility of people to diseases and the progression of diseases and polymorphisms. A gene shows a significant relationship with the probability of diabetes. In this study, the possibility of the association of rs7903146 polymorphism with diabetes has been determined, so it can be said that rs7903146 polymorphism can be used as an indicator and marker to detect the susceptibility to diabetes in other research, and considering that this polymorphism Gene Morphism shows a different frequency distribution in different regions, it seems that studying target gene variants in different populations to find their relationship with diabetes is important.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Saeifar F, Momen Maragheh S, Ghaedi E, Khademi SM, Dabirifar S, Soltanzade H. Investigation of rs7903146 Polymorphism in TCF7L2 Gene in Patients with Type 2 Diabetes. *Razi J Med Sci.* 2024(27 Jan);30.175.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

***This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

مقدمه

دیابت به عنوان یک بیماری ناهمگن با کاهش حساسیت به انسولین و نقص ترشح انسولین مشخص می‌شود (۱). به طور کلی دیابت به چهار گروه، دیابت نوع یک، دیابت نوع دو، دیابت حاملگی و دیابت به علل متفرقه تقسیم‌بندی می‌شود که در این میان دیابت نوع دو بیشترین نوع دیابت بوده که % ۸۵-۹۰ کل موارد دیابت را شامل می‌شود (۲). شواهد در حال ظهور نشان می‌دهد که پلی مورفیسم ژنتیکی رایج و نادر می‌تواند بر خطر ابتلا به عوارض دیابتی تأثیرگذار باشد (۳). دیابت نوع ۲ یک گروه ناهمگن از اختلالات است که معمولاً با ناتوانی سلول‌های بتا لوزالمعده در افزایش ترشح انسولین برای جبران مقاومت به انسولین در بافت‌های محیطی مشخص می‌شود (۴). دیابت نوع ۲ در بزرگسالان تشخیص داده شده است و با چاقی، سبک زندگی، سن، سابقه خانوادگی و ژنتیک مرتبط است، از لحاظ ژنتیکی، پلی مورفیسم ژن‌های زیادی در ارتباط با این بیماری شناخته شده‌اند (۵). علت ابتلا به دیابت نوع ۲ آمیزه‌ای از سبک زندگی و عوامل ژنتیکی است، در حالی که فرد می‌تواند برخی از این امور مانند رژیم غذایی و چاقی را کنترل کند سایر مسایل مانند بالا رفتن سن، مونث بودن، و ژنتیک قابل کنترل نیستند. با این حال تاکنون دلیل قطعی پیدایش این بیماری مشخص نشده و نرخ شیوع آن نیز رو به افزایش است. در دهه اخیر، به طور نگران کننده‌ای شیوع این بیماری در ایران افزایش یافته است (۶). با توجه به گستردگی، پیچیدگی و چند عاملی بودن بیماری دیابت، شناخت دقیق عوامل ژنتیکی مرتبط با دشواری‌هایی همراه است، و بیشتر افراد مبتلا به دیابت دارای بسیاری از ژن‌هایی هستند که هر کدام از آن‌ها می‌توانند در افزایش احتمال ابتلا به دیابت نوع ۲ نقش مشارکتی اندکی داشته باشند (۷). اگر یکی از دوقلوهای همسان دیابت داشته باشد شانس دیگری در ابتلا به دیابت در طول دوره زندگی چیزی بیش از ۹۰٪ خواهد بود در حالی که این میزان برای دوقلوهای غیرهمسان ۲۵-۵۰٪ است و تا سال ۲۰۱۱، بیش از ۳۶ ژن کشف شده است که در ابتلا فرد به دیابت نوع ۲ مشارکت دارند (۸). همه این ژن‌ها با هم تنها ۱۰٪ کل مؤلفه ارثی این بیماری را

تشکیل می‌دهند (۹). برای نمونه توالی ژن TCF7L2 خطر پیشرفت دیابت را تا ۱/۵ برابر افزایش می‌دهد و بزرگترین خطر ژنتیکی شایع است (۱۰). بسیاری از ژن‌های مرتبط با دیابت درگیر عملکرد سلول بتا هستند (۱۱). از ژن‌های متعددی که در بروز دیابت دخیل هستند یا ابتلای به دیابت را تسهیل می‌کنند، ژن TCF7L2 می‌باشد (۱۲). بر روی این ژن‌ها نواحی پلی مورفیسمی گوناگونی شناسایی شده‌اند که ارتباط میان آن‌ها با اختلال در ترشح انسولین، تولید گلوکز و هم چنین مقاومت به انسولین به واسطه تأثیر مستقیم بر سلول‌های بتا پانکراس به اثبات رسیده است (۱۳). پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs7903146 واقع در اینترون شماره ۳ ژن TCF7L2 می‌باشد که به طور قابل توجهی با دیابت نوع ۲ موثر است. بیان TCF7L2 در سلول‌های پانکراس بیماران دیابتی نوع ۲ نسبت به افراد سالم که با کاهش ترشح انسولین همراه بوده است گزارش شد (۱۳). جدا از تأثیر واریانت TCF7L2‌های بر ساخت سلول و رهایی انسولین از بتای پانکراس، مطالعات متعددی نیز از کاهش ترشح انسولین در پاسخ به افزایش بیان TCF7L2 در پانکراس گزارش شده است (۱۴). ژن TCF7L2 یک فاکتور رونویسی را درگیر در مسیر سیگنالینگ Wnt می‌کند، که نقش مهمی در توسعه جزایر پانکراس و چربی بازی می‌کند. ژن TCF7L2 یکی از مهمترین ژن‌های کاندید برای T2DM محسوب می‌شود و نقش مهمی در هموستاز گلوکز خون و عملکرد بتا سلول دارد. در اوایل سال ۲۰۰۶، یک مطالعه بزرگ در مقیاس GWAS گزارش داد که برخی از پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی تک (SNP) در ژن TCF7L2 به شدت با خطر ابتلا به T2DM در یک نمونه کنترل موردی ایسلند همراه بودند (۱۵). واریانت rs7903146 از مهمترین واریانت‌ها است که در سایر جمعیت‌ها ارتباط آن با دیابت اثبات شده است ولی تا کنون مطالعه‌ای در آذربایجان شرقی بر ارتباط نقش TCF7L2 در ایجاد ابتلا به دیابت نوع ۲ صورت نگرفته است، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs7903146 در ژن TCF7L2 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در آذربایجان شرقی انجام شد (۱۵).

روش کار

مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.IAU.TABRIZ.REC.1398.104 در کمیسیون کد اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به تصویب رسید. در این مطالعه تعداد ۱۰۱ بیمار غیر خویشاوند جهت ارائه نمونه خون به کلینیک دیابت دعوت شدند. اطلاعات اولیه بیماران از قبیل شاخص توده بدن، جنسیت و سن در یک پرسشنامه ثبت و جهت رعایت اصول اخلاقی در بالای هر پرسشنامه کد رهگیری درج شد. همچنین برای فراخوانی افراد کنترل، تعداد ۱۰۱ فرد سالم غیر خویشاوند از جمعیت عمومی انتخاب شدند. برخی از ملاک‌های ورود به مطالعه شامل عدم پیشینه خانوادگی ابتلا به دیابت نوع دو حداقل در دو نسل قبل و آزمون منفی برای تست تحمل گلوکز خوراکی بود. افراد گروه کنترل از لحاظ سنی با افراد بیمار مطابقت داشتند. در این مطالعه از هر فرد حدود ۲ سی‌سی نمونه خون گرفته شد و در لوله‌های حاوی EDTA، جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده با فلاسک حاوی یخ خشک به آزمایشگاه انتقال داده شدند و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. لوله‌های حاوی نمونه خون افراد بیمار و کنترل جداگانه شماره‌گذاری شدند و جنسیت آن‌ها نیز بر روی لوله‌ها ذکر گردید. در این پژوهش برای استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج شرکت امینسان استفاده شد که مطابق با دستورالعمل کیت مربوطه، مراحل استخراج به طور کامل انجام شد. در نهایت، محلول DNA به منظور نگهداری طولانی مدت، در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به جهت کسب اطمینان از استخراج DNA از الکتروفورز و مشاهده DNA بر روی ژل آگارز استفاده شد. سپس برای تعیین نواحی کدکننده ژن از سایت NCBI استفاده گردید تا نواحی اینترونی و اگزونی ژن و واریانتهای آن‌ها تعیین گردد.

پروسه PCR نمونه‌های خونی در این مطالعه بدین گونه بود که ابتدا پرایمرهای F و R به نسبت یک دوم رقیق‌سازی شد. بدین منظور ابتدا پرایمرهای مذکور از فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج شد. به اندازه ۱۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه به داخل میکروتیوپ حاوی

پرایمر F و ۱۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه به داخل میکروتیوپ حاوی پرایمر R منتقل شد و هر دو میکروتیوپ تکان داده شد. سپس ۱ میکرولیتر از هر پرایمر در میکروتیوپ مجزا ریخته شد و به داخل هر کدام به اندازه ۲ میکرولیتر آب دیونیزه افزوده شد. متعاقباً یک میکروتیوپ ۰/۵ میلی‌لیتری خالی، بر روی یخ آماده شد و داخل آن ۱ میکرولیتر از پرایمر F و ۱ میکرولیتر از پرایمر R رقیق شده، ریخته شد. سپس ۱۳ میکرولیتر Master Mix و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه به همان میکروتیوپ منتقل شد و محتویات آن یک دور کوتاه به آرامی اسپین گردید. سپس به داخل آن ۲ میکرولیتر از محتویات میکروتیوپ DNA استخراج شده منتقل شده و یک دور کوتاه به آرامی اسپین گردید. نهایتاً میکروتیوپ با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، در دستگاه PCR قرار داشت. بعد این که نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد دستگاه طبق جدول ۲ تنظیم گردید. پس از اتمام PCR، میکروتیوپ‌های حاوی نمونه‌های DNA تکثیر یافته، به فریزر با دمای ۲۱- درجه سانتی‌گراد منتقل گشته و تا انجام الکتروفورز نگهداری گردید. تمامی این مراحل برای سایر نمونه‌های گرفته شده از افراد تکرار گردید.

برای انجام الکتروفورز محصولات PCR و مشاهده قطعات DNA ابتدا ژل آگارز ۱٪ به همراه چاهک‌های آن تهیه گردید. سپس از میکروتیوپ‌های حاوی محصولات حاصل از PCR تمامی نمونه‌ها، به اندازه ۵ میکرولیتر به داخل چاهک‌های ژل منتقل گردید. در چاهک اول نیز DNA Ladder 50 bp به همان اندازه ریخته شد. دستگاه الکتروفورز به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۹۰ تنظیم شده و عمل الکتروفورز انجام گردید. پس از اتمام، جهت رنگ‌آمیزی ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم برمایید قرار داده شد. سپس به دستگاه ترانس ایلومیناتور جهت مشاهده باندها منتقل شد.

با توجه به اینکه از آنزیم‌های محدودکننده، جایگاه برشی آنزیم مشخصی دارند، از هضم آنزیمی برای شناسایی پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه استفاده شد. برای انجام این کار، ابتدا توالی قطعات تکثیر شده از پایگاه NCBI گرفته شد و با نرم افزار webcutter

جدول ۱- توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول (جفت باز)
Forward	5'-ACA ATT AGA GAG CTA AGC ACT TTT TAG GTA-3'	۲۶
Reverse	3'-GTG AAG TGC CCA AGC TTC TC-5'	۱۹

جدول ۲- شرایط چرخه دمایی در انجام واکنش PCR برای هر دو جفت پرایمر

تعداد سیکل	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	مراحل
۱	۶ دقیقه	۹۴	واسرشت اولیه
۳۴	۳۰ ثانیه	۹۴	واسرشت
۳۴	۳۰ ثانیه	۶۵	دمای اتصال
۳۴	۴۵ ثانیه	۷۲	طویل‌سازی
۱	۵ دقیقه	۷۲	طویل‌سازی نهایی
-	∞	۴	نگهداری

موجود در سایت <http://rna.lundberg.yu.se/cutterz> آنزیم مناسب جهت هضم انتخاب شد. ابتدا به اندازه ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR یکی از نمونه‌ها، داخل میکروتیوپ ریخته شد سپس ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه به آن افزوده شد. همچنین به اندازه ۲ میکرولیتر از buffer و ۲ میکرولیتر از آنزیم محدود کننده RsaI به داخل آن اضافه شد. سپس به آرامی با عمل پیپتینگ مخلوط شد و درب میکروتیوپ محکم بسته شد و پارافین گذاری گردید. این مراحل برای سایر نمونه‌ها هم تکرار گردید. نهایتاً میکروتیوپ در داخل بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد.

مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه گردید. شرایط چرخه دمایی در انجام واکنش PCR برای هر دو جفت پرایمر در جدول شماره ۲ آمده است. پس از تکمیل آزمایشات، داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی ارتباط ژنوتیپ‌ها با بروز بیماری از آزمون کای مربع استفاده شد. برای آنالیز متغیرهای ژنتیکی، نوع وحشی SNPهای TCF7L2 با صفر، ژنوتیپ هتروزیگوت با ۱ و ژنوتیپ هموزیگوت با ۲ کدبندی شدند. توزیع ژنوتیپ برای SNPهای مورد مطالعه محاسبه و برای تعیین انحراف از تعادل هاردی واینبرگ از آزمون chi-square با درجه آزادی یک استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۳۹/۳ درصد مذکر و ۶۰/۷ درصد مونث بودند. میانگین سنی در میان آن‌ها ۵۲ سال بود. در میان نمونه‌های مذکر ۳۷ درصد سالم و ۶۳ درصد دیابتی بودند و در میان نمونه‌ها مونث ۱۸ درصد سالم و ۸۲ درصد دیابتی بودند. ژل الکتروفورز جهت تعیین قطعات DNA، تحت تأثیر جریان الکتریکی از

موجود در سایت <http://rna.lundberg.yu.se/cutterz> آنزیم مناسب جهت هضم انتخاب شد. ابتدا به اندازه ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR یکی از نمونه‌ها، داخل میکروتیوپ ریخته شد سپس ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه به آن افزوده شد. همچنین به اندازه ۲ میکرولیتر از buffer و ۲ میکرولیتر از آنزیم محدود کننده RsaI به داخل آن اضافه شد. سپس به آرامی با عمل پیپتینگ مخلوط شد و درب میکروتیوپ محکم بسته شد و پارافین گذاری گردید. این مراحل برای سایر نمونه‌ها هم تکرار گردید. نهایتاً میکروتیوپ در داخل بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد.

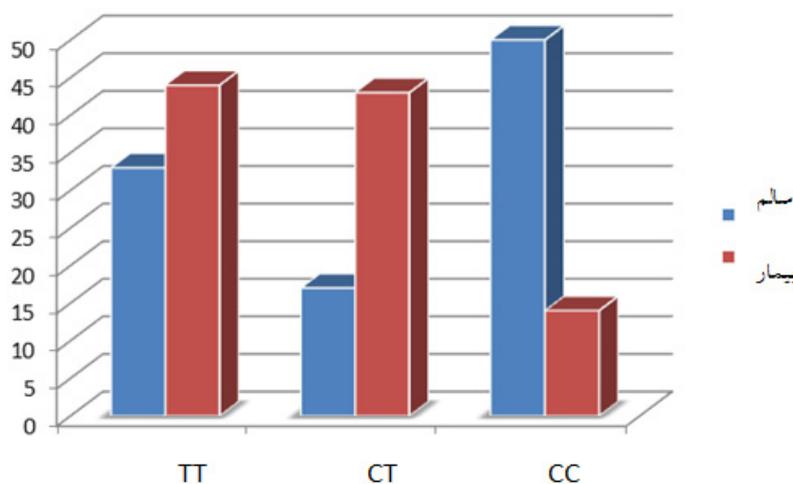
الکتروفورز محصولات PCR تیمار شده با آنزیم محدود کننده بدین گونه بود که ابتدا ژل آگاروز ۱٪ تهیه و چاهک‌های آن ایجاد گردید. سپس به اندازه ۵ میکرولیتر از DNA Ladder 50 bp به چاهک اول و به اندازه ۷ میکرولیتر از محصولات PCR تیمار شده با آنزیم محدودکننده PST1 با ۲ میکرولیتر از Loading buffer مخلوط شد، در سایر چاهک‌ها بارگذاری شد. نهایتاً طبق دستور ذکر شده در مراحل قبلی الکتروفورز انجام گردید. برای مشاهده قطعات برش داده شده با آنزیم (مرحله قبل)، ژل آگاروز به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم برماید جهت رنگ‌آمیزی قرار داده شد. نهایتاً ژل به دستگاه ترانس ایلومیناتور منتقل شد و باندهای حاوی قطعات DNA برش داده شده، مشاهده و عکس‌برداری گردید. مراحل انجام پروسه تعیین پلی مورفیسم

شد. نمونه‌ها بدون نیاز به لودینگ بافر به مقدار ۶-۵ میکرولیتر لود شد. به علت غلظت ژل آگارز بهتر است سرعت حرکت قطعه DNA کم باشد. برای این منظور در ولتاژ ۸۵ از قطب منفی به مثبت قرار داده شد. همچنین طول قطعه مورد نظر ۱۸۸ جفت باز بود که در فاصله بین باندهای ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت بازی از لدر تشکیل شد به علت سهولت در خوانش از لدر ۵۰ جفت بازی استفاده شد. نتایج الکتروفورز محصول PCR تیمار شده با آنزیم RsaI در افراد سالم نشان داد که پلی مورفیسم TT در ۱۸۸ جفت بازی باند نشان داد در حالیکه پلی مورفیسم TC در ۲۹-۱۸۸ - ۱۵۹ جفت بازی باند داشت و CC اگر برش بخورد باند ۲۹ و ۱۵۹ می‌دهد که اغلب ۲۹ دیده نمی‌شود. محصولات PCR حاصل از DNA استخراج شده از نمونه‌های خونی افراد مبتلا به دیابت، با آنزیم محدود کننده RsaI اثر داده شد و مراحل تکنیک الکتروفورز انجام شده برای نمونه‌های افراد سالم، برای نمونه‌های بیمار هم تکرار گردید. سه نوع ژنوتیپ مورد نظر در این تحقیق شامل TT، CC و TC بود که فرکانس‌ها آن‌ها در جامعه هدف مورد مطالعه در این تحقیق که

قطب منفی به مثبت قرار داده شد. قطعات کوچکتر DNA در ژل خیلی سریعتر از قطعات بزرگتر حرکت می‌کنند. جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده از روش ژل آگارز استفاده شده است. به منظور تکثیر یک نسخه منفرد یا نسخه‌های کمی از یک قطعه DNA با توالی خاص از تکنیک PCR استفاده شد. لدر مورد استفاده ۵۰ جفت بازی می‌باشد. طول قطعه مورد نظر ۱۸۸ جفت باز بود که در فاصله بین باندهای ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت بازی از لدر تشکیل شد. مراحل انجام الکتروفورز محصولات PCR در نمونه‌های افراد مبتلا به دیابت مشابه نمونه‌های افراد سالم انجام گرفت. لدر مورد استفاده ۵۰ جفت بازی می‌باشد. طول قطعه مورد نظر ۱۸۸ جفت باز بود که در فاصله بین باندهای ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت بازی از لدر تشکیل شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های افراد بیمار نشان داد که طول قطعه مورد نظر ۱۸۸ جفت باز بود که در فاصله بین باندهای ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت بازی از لدر تشکیل شد و از لدر ۵۰ جفت بازی استفاده شد. نمونه‌های حاصل از تیمار محصولات PCR با آنزیم، بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز

جدول ۳- درصد آلل‌های مورد مطالعه و اختلاف درصد آن‌ها در افراد سالم و بیمار

نام آلل	درصد آلل در افراد بیمار	درصد آلل در افراد سالم	درصد اختلاف بین افراد سالم و بیمار	کای مجذور	P
T	۶۴/۵ درصد (۱۲۹)	۴۲/۱ درصد (۸۵)	۲۲ درصد	۲۰/۲۹۳	۰/۰۰۰
C	۳۵/۵ درصد (۷۱)	۵۷/۹ درصد (۱۱۷)	۲۲ درصد		
مجموع	% ۱۰۰	% ۱۰۰			



نمودار ۱- درصد فراوانی ژنوتیپ‌ها به تفکیک در نمونه‌های سالم و بیمار

مورفیسیم می‌باشد در گروه سالم ۴۲/۱ درصد و در گروه بیمار ۶۴/۵ می‌باشد که ۲۲ درصد در گروه بیمار افزایش نشان می‌دهد که احتمالاً بین افزایش ال ال T و ریسک ابتلا به دیابت نوع دو رابطه‌ای وجود داشته باشد و ریسک ابتلا در گروه بیمار ۲/۵۰۱ می‌باشد و از آنجا که بیشتر از یک می‌باشد احتمال ریسک ابتلا به بیماری موجود است؛ در ضمن ریسک ابتلا در گروه سالم ۶۳۸/ می‌باشد که کمتر از یک می‌باشد.

بحث

با توجه به این که امروزه دیابت در سراسر دنیا به صورت یک اپیدمی بی‌سابقه در حال گسترش می‌باشد و هم چنین با توجه به نقش عوامل ژنتیکی در ایجاد بیماری دیابت نوع دو، بررسی ژن های مرتبط با این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که فراوانی الی C که ال غالب می‌باشد در گروه سالم ۵۷/۹ درصد در گروه بیمار ۳۵/۵ درصد می‌باشد که ۲۲ درصد کاهش را نشان می‌دهد و فراوانی الی T که ال پللی مورفیسیم می‌باشد در گروه سالم ۴۲/۱ درصد و در گروه بیمار ۶۴/۵ درصد می‌باشد که ۲۲ درصد در گروه بیمار افزایش نشان می‌دهد که احتمالاً بین افزایش ال ال T و ریسک ابتلا به دیابت نوع دو رابطه‌ای وجود داشته باشد و ریسک ابتلا در گروه بیمار ۲/۵۰۱ می‌باشد و از آنجا که بیشتر از یک می‌باشد احتمال ریسک ابتلا به بیماری موجود است. در ضمن ریسک ابتلا در گروه سالم ۶۳۸/ می‌باشد که کمتر از یک می‌باشد. از طرفی، فراوانی ژنوتیپ‌ها به صورت $TT=۳۳/۷$ ، $CT=۱۶/۸$ و $CC=۴۹/۵$ (درصد) برای افراد سالم بدست آمد و در افراد بیمار نیز فراوانی ژنوتیپ‌ها به صورت $TT=۴۳$ ، $TC=۴۳$ و $CC=۱۴$ (درصد) محاسبه گردید. همسو با نتایج مطالعه حاضر مطالعات متعددی نقش پلی‌مورفیسیم ژن (rs7903146) TCF7L2 را در گستره‌ای از بیماری‌ها گزارش کردند و همچنین بین پلی‌مورفیسیم ژن (rs7903146) TCF7L2 و احتمال ابتلا به برخی بیماری‌ها نیز بررسی های حدودی انجام شده است. به طور خاص در رابطه با بیماری‌های سندرم متابولیک، پاسخ انسولین و HOMA-IR به مکمل ALE تعامل با پلی‌مورفیسیم تک نوکلئوتیدی

از ۱۰۱ نفر سالم و ۱۰۰ نفر بیمار تشکیل شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. TT یک باند ۱۸۸ و TC سه باند ۱۵۹-۱۸۸-۲۹ که ۲۹ اغلب دیده نمی‌شود و در CC دو باند ۱۵۹ و ۲۹ دیده می‌شود که اغلب ۲۹ دیده نمی‌شود. بر روی داده‌های حاصل از فراوانی ژنوتیپ‌ها، آزمون کای اسکوئر (chi-square) انجام گرفت. سه نوع ژنوتیپ مورد نظر در این تحقیق شامل TT، CT و CC بود که فرکانس‌ها آنها در جامعه هدف مورد مطالعه در این تحقیق که از ۱۰۱ نفر سالم و ۱۰۰ نفر بیمار تشکیل شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. بر روی داده‌های آنالیز آماری انجام شده که در نمودار ۱ به تفکیک گروه‌ها ارائه شد. نتایج نمودار ۱ نشان می‌دهد که در گروه سالم فراوانی TT ۳۳/۷ درصد (۳۴ نمونه)، CT ۱۶/۸ درصد (۱۷ نمونه) و CC ۴۹/۵ درصد (۵۰ نمونه) می‌باشد که فراوان‌ترین پلی‌مورفیسیم در کل نمونه‌ها CC با ۵۰ درصد است. به تفکیک در گروه بیمار فراوانی TT ۴۳ درصد (۴۳ نمونه)، CC ۱۴ درصد (۱۴ نمونه) و CT ۴۳ درصد (۴۳ نمونه) می‌باشد که فراوان‌ترین پلی‌مورفیسیم در کل نمونه‌ها TT است. نتایج نشان می‌دهد که در بین افراد سالم، ژنوتیپ CC بیشترین و ژنوتیپ CT کمترین فراوانی را دارد و در بین افراد بیمار ژنوتیپ TT بیشترین و ژنوتیپ CC کمترین فراوانی را دارد. مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها بین افراد سالم و بیمار معنی‌دار نبوده است ($P > ۰/۰۵$). مربع خی ۳۲/۵۶ می‌باشد.

پس از بررسی فراوانی ژنوتیپ‌ها، فرکانس آلل‌ها و درصد محاسبه گردید و نتایج بدست آمده در جدول ۳ ارائه شده است. داده‌های حاصل از بررسی فرکانس آلل‌ها در جامعه هدف مورد مطالعه نشان داد که آلل T در افراد بیمار بیشترین فراوانی را داشته و نسبت به افراد سالم ۲۲ درصد افزایش نشان می‌دهد. آلل C نیز در افراد سالم بیشترین فراوانی را داشته و نسبت به افراد بیمار ۲۲ درصد کاهش نشان می‌دهد. این مقایسه‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً بین افزایش آلل T و ابتلا به دیابت رابطه وجود داشته باشد. فراوانی الی C که ال غالب می‌باشد در گروه سالم ۵۷/۹ درصد در گروه بیمار ۳۵/۵ درصد می‌باشد که ۲۲ درصد کاهش را نشان می‌دهد و فراوانی الی T که ال پللی

نوع ۲ دارد. مطالعات نشان دادند که توانایی کاهش یافته لوزالمعده برای پاسخ به اینکرتین‌ها وجود دارد و به نظر می‌رسد نقص ترشح انسولین برای گلوکز خوراکی انتخابی است و تزریق گلوکز درجه بندی شده نشان داد که پاسخ ترشح انسولین به گلوکز داخل وریدی بیش از یک طیف فیزیولوژیکی غلظت گلوکز به خوبی در افراد مبتلا به ژنوتیپ دیابت نوع ۲ مرتبط است. در مطالعه مشابه دیگری، نتایج نشان داد که چند آلل rs12255372، T، rs7903146 و rs290487 از TCF7L2 استعداد ابتلا به T2DM را در جمعیت کرد ایران نشان می‌دهد. در بررسی پراکندگی پلی مورفیسم ژن (TCF7L2) rs7903146 در بیماران دیابتی نوع ۲ در غرب استان مازندران به این نتیجه دست یافتند که rs7903146 ژن TCF7L2، ژن مستعد مهمی برای دیابت نوع ۲ در ایران است. در پژوهش دیگری این نتیجه حاصل شد که آلل T از SNP rs7903146 با خطر بالای قابل توجهی از دیابت نوع ۲ در جمعیت الجزایر در ارتباط است. ارتباط پلی مورفیسم‌های rs7903146، rs12255372 و rs290487 در ژن TCF7L2 مبتلا به دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار گرفت و این نتیجه به دست آمد که آلل T از پلی مورفیسم‌های rs7903146، rs12255372 و rs290487 از ژن TCF7L2 استعداد ابتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیت کردنشین ایرانی را اعطا می‌کند. قابل ذکر است که این نتیجه محدود به جمعیت مورد مطالعه حاضر می‌باشد و به مطالعات بیشتر بر روی تعداد بیشتری از افراد و نژادهای متفاوت برای تایید ارتباط پلی مورفیسم TCF7L2 با بیماری دیابت نوع ۲ نیاز می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد انواع پلی مورفیسم‌ها عاملی برای تنوع ژنتیکی و تعیین کننده تنوع فنوتیپی بین افراد می‌باشند و ممکن است در حساسیت افراد در ابتلا به بیماری‌ها و پیشرفت بیماری‌ها و پلی مورفیسم‌های ژنی در احتمال ابتلا به دیابت ارتباط معناداری را نشان دهد. در این مطالعه، احتمال ارتباط پلی مورفیسم rs7903146 با ابتلا به دیابت مشخص شده، بنابراین می‌توان بیان کرد که

rs7903146 در TCF7L2 را نشان دادند. علاوه بر بیماری‌های سندرم متابولیک بطور ویژه در دیابت حاملگی نیز همسو با نتایج مطالعه حاضر گزارش شده است که پلی مورفیسم rs7903146 TCF7L2 یک عامل خطر برای دیابت حاملگی است. با این حال، حضور اضافی آلل‌های خطرناک TCF7L2 rs7903146 باعث افزایش تأثیر منفی سابقه دیابت بارداری بر صفات متابولیکی مرتبط با T2DM نمی‌شود. پلی مورفیسم ژن (rs7903146) TCF7L2 با بیماری دیابت نوع ۲ مرتبط می‌باشد و این پلی مورفیسم فاکتور خطر ژنتیکی مهمی برای توسعه و پیشرفت دیابت نوع ۲ می‌باشد. اسکارینگلای گزارش کردند که یک ارتباط ژنتیکی بین TCF7L2 و EXT وجود دارد. در خصوص دیابت نوع دو علاوه بر پلی مورفیسم ژن (rs7903146) TCF7L2 سایر ژن‌های مرتبط با دیابت نیز در مطالعات بررسی شده است. به طور مثال دانشپور و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای نشان دادند که ژن CXCL5 پتید فعال کننده نوتروفیل از منشا سلول‌های اپیتلیال) نامیده می‌شود که در بروز بیماری‌های قلبی-عروقی و برخی دیگر از بیماری‌ها نقش دارد. این مطالعه از نظر تأثیر در ابتلا به دیابت نوع دو با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. با این حال مطالعات نشان داد پلی مورفیسم ژن GFPPT2 با خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ همراه است و نشان دهنده تفاوت معنی دار در فراوانی ژنوتیپ TT در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ بود. علت تفاوت نتایج در مطالعات مختلف ممکن است به علت تفاوت در بررسی دو ژن مختلف باشد و اینکه موقعیت قرارگیری ژن GFPPT2 و مکانیسم اثر آن با ژن TCF7L2 متفاوت است ولی هر دو در ابتلا به دیابت موثر هستند. در خصوص ارتباط بین سایر ژن‌ها و احتمال ابتلا به دیابت می‌توان به مطالعه فرالینگ اشاره کرد که برای اولین بار ارتباط میان ژن FTO و خطر ابتلا به دیابت نوع دو با انجام مطالعات همبستگی گسترده‌ی ژنوم در جمعیت اروپاییان سفید و پوست مورد شناسایی قراردادند. این مطالعه نشان داد که ارتباط میان ژن FTO و خطر ابتلا به دیابت نوع دو با نتایج مطالعه حاضر همسو است. ژن TCF7L2 بیشترین تأثیر را در خطر ابتلا به دیابت

2012;16(4):325-31.

11. Snyder M, Wieland J. Complementary and alternative therapies: what is their place in the management of chronic pain? *Nurs Clin North Am.* 2003;38(3):495-508.

12. Wright J, Adams D, Vohra S. Complementary, holistic, and integrative medicine: music for procedural pain. *Pediatr Rev.* 2013;34(11):e42-6.

13. Aydin D, Sahiner NC. Effects of music therapy and distraction cards on pain relief during phlebotomy in children. *Appl Nurs Res.* 2017;33:164-168.

14. Nguyen TN, Nilsson S, Hellström AL, Bengtson A. Music therapy to reduce pain and anxiety in children with cancer undergoing lumbar puncture: a randomized clinical trial. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2010;27(3):146-55.

15. Caprilli S, Anastasi F, Grotto RP, Scollo Abeti M, Messeri A. Interactive music as a treatment for pain and stress in children during venipuncture: a randomized prospective study. *J Dev Behav Pediatr.* 2007;28(5):399-403.

پلی مورفیسیم rs7903146 به عنوان شاخص و مارکری جهت تشخیص استعداد ابتلا به دیابت در سایر تحقیقات استفاده شود و با توجه به اینکه این پلی مورفیسیم‌های ژنی، توزیع فراوانی متفاوتی در مناطق مختلف را نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد که مطالعه‌ی واریانت‌های ژن‌های هدف در جمعیت‌های مختلف برای یافتن ارتباط آن‌ها با ابتلا به دیابت امری مهم و ضروری است.

References

1. Hu C, Hart SN, Gnanaolivu R, Huang H, Lee KY, Na J, et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2021;384(5):440-451.

2. Foulkes WD. The ten genes for breast (and ovarian) cancer susceptibility. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(5):259-260.

3. Arts-de Jong M, de Bock GH, van Asperen CJ, Mourits MJ, de Hullu JA, Kets CM. Germline BRCA1/2 mutation testing is indicated in every patient with epithelial ovarian cancer: A systematic review. *Eur J Cancer.* 2016;61:137-45.

4. Speight B, Tischkowitz M. When to Consider Risk-Reducing Mastectomy in BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers with Advanced Stage Ovarian Cancer: a Case Study Illustrating the Genetic Counseling Challenges. *J Genet Couns.* 2017;26(6):1173-1178.

5. Shi H, You Z, Guo Y. (Mutation of breast cancer susceptibility gene in ovarian cancer and its clinical significance). *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1998;33(11):676-8.

6. Konstantinopoulos PA, Norquist B, Lacchetti C, Armstrong D, Grisham RN, Goodfellow PJ, et al. Germline and Somatic Tumor Testing in Epithelial Ovarian Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2020;38(11):1222-1245.

7. Maindet C, Burnod A, Minello C, George B, Allano G, Lemaire A. Strategies of complementary and integrative therapies in cancer-related pain-attaining exhaustive cancer pain management. *Support Care Cancer.* 2019;27(8):3119-3132.

8. Deng G. Integrative Medicine Therapies for Pain Management in Cancer Patients. *Cancer J.* 2019;25(5):343-348.

9. Giannitrapani KF, Holliday JR, Miake-Lye IM, Hempel S, Taylor SL. Synthesizing the Strength of the Evidence of Complementary and Integrative Health Therapies for Pain. *Pain Med.* 2019;20(9):1831-1840.

10. Running A, Seright T. Integrative oncology: managing cancer pain with complementary and alternative therapies. *Curr Pain Headache Rep.*