Original Article

The relationship between rs896854 polymorphism of *TP53INP1* gene and type 2 diabetes in Delijan City, Iran

Zahedian N[1], Salavatifar M[2*], Jamshidain F[3]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, East Tehran Branch (Ghiamdasht), Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of aerospace physiology, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, I.R. Iran.
3- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, East Tehran Branch (Ghiamdasht), Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2023/01/17 | Accepted: 2023/06/6

Abstract:

Background: Genetic engineering studies on the *TP53INP1* gene have determined that a dysfunctional mitochondrial mitophagy disorder is the main source of chronic oxidative stress and leads to an increased susceptibility to diabetes. The aim of this study was to evaluate the relationship between rs896854 polymorphism of TP53INP1 gene and type 2 diabetes.
Materials and Methods: In this case-control study, blood samples were collected from 124 patients with type 2 diabetes and 100 healthy individuals from the residents of Delijan City, Markazi Province, Iran, in 2022. After extracting genomic DNA by the salting out method, the rs896854 location in *the TP53INP1* gene was evaluated using the Tetra-Primer Arms-PCR method.
Results: The frequency rates of TT, CC, and TC genotypes were 13%, 29%, and 58% in the patient group and 12%, 17%, and 71% in the control group, respectively. In addition, the frequency rates of T and C alleles were 42% and 58% in the patient group and 47.5% and 52.5% in the control group, respectively. Statistical analysis using the Chi-square test revealed that the rs896854 polymorphism of *TP53INP1* gene had no significant relationship with the occurrence of diabetes in the studied population ($P<0.05$).
Conclusion: According to the current findings, the presence of T or C allele at rs896854 location in TP53INP1 gene had no significant relationship with the probability of the occurrence of type 2 diabetes. To confirm these findings, it is necessary to carry out further investigations in different populations with a larger sample size.

Keywords: Type 2 diabetes, Rs896854 polymorphism, TP53INP1 gene

***Corresponding Author**
Email: salavati@ari.ac.ir
Tel: 0098 21 883 66030
Fax: 0098 21 883 66030

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2023; Vol. 27, No 3, Pages 306-314

Please cite this article as: Zahedian N, Salavatifar M, Jamshidain F. The relationship between rs896854 polymorphism of *TP53INP1* gene and type 2 diabetes in Delijan City, Iran. ***Feyz*** 2023; 27(3): 306-14.

ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs896854 ژن *tp53inp1* و دیابت نوع ۲ در شهر دلیجان

نیلوفر زاهدیان[۱]، مریم صلواتی فر[۲*]، فرانک جمشیدیان[۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: مطالعات مهندسی ژنتیک بر روی ژن *tp53inp1* مشخص کرده که اختلال میتوفاژی میتوکندری‌های ناکارآمد، منبع اصلی استرس اکسیداتیو مزمن بوده و منجر به افزایش استعداد ابتلا به دیابت می‌شود. هدف این مطالعه ارزیابی ارتباط پلی‌مورفیسم rs896854 در ژن *tp53inp1* و دیابت نوع ۲ بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موردی-شاهدی، نمونه‌های خون از ۱۲۴ فرد بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۱۰۰ فرد سالم از ساکنان شهر دلیجان، استان مرکزی تهیه شد. پس از استخراج DNA ژنومی با روش Salting out، جایگاه rs896854 در ژن *tp53inp1* با استفاده از روش Tetra-Primer Arms-PCR ارزیابی گردید.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CC، TC به ترتیب در گروه بیمار ۱۳، ۲۹ و ۵۸ درصد و در گروه کنترل ۱۲، ۱۷ و ۷۱ درصد بودند. به علاوه فراوانی آلل‌های T و C به ترتیب در گروه بیمار ۴۲ درصد و ۵۸ درصد و در گروه کنترل ۴۷/۵ درصد و ۵۲/۵ درصد بود. آنالیز آماری با آزمون مربع کای مشخص نمود که پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1*، ارتباط معناداری با بروز دیابت در جمعیت موردمطالعه نداشت ($P>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: طبق یافته‌های مطالعه حاضر، وجود آلل T یا C در جایگاه rs896854 در ژن *tp53inp1*، با احتمال ابتلا به دیابت نوع ۲ ارتباط معنی‌داری نداشت. برای تائید این یافته‌ها، نیاز به بررسی بیشتر در جمعیت‌های مختلف با حجم نمونه بالاتر، ضروری است.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، پلی‌مورفیسم rs896854، ژن *tp53inp1*

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۳، مرداد-شهریور ۱۴۰۲، صفحات ۳۱۴-۳۰۶

مقدمه

دیابت نوع ۲ (T2DM) از شایع‌ترین اختلالات متابولیک در جهان است و گسترش آن به علت ترکیبی از اختلال در ترشح انسولین توسط سلول‌های بتای پانکراس و ناتوانی یا کم‌توانی سلول‌های حساس به انسولین می‌باشد [۱]. سازوکارهای مولکولی دخیل در ساخت و ترشح انسولین و همچنین پاسخ بافت‌ها به آن، نیازمند تنظیم دقیق هستند. بنابراین، نقص در هر یک از مراحل این فرایند، می‌تواند منجر به عدم تعادل متابولیک و در نهایت بروز T2DM شود [۲]. این بیماری به صورت افزایش گلوکز خون در شرایط مقاومت سلول‌های بدن به انسولین یا کمبود نسبی آن بروز می‌نماید [۳]. افراد مبتلا بیش از سایر افراد، در معرض نارسایی‌های کلیوی و عوارضی چون اختلالات قلبی، عروقی، عصبی و چشمی قرار دارند. شیوع T2DM در ایران حدود ۷/۷ درصد گزارش شده است [۴].

۱. کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

۲. استادیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:** تهران، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، پژوهشگاه هوافضا، گروه فیزیولوژی هوافضا

تلفن: ۰۲۱۸۸۳۶۶۰۳۰ **دورنویس:** ۰۲۱۸۸۳۶۲۰۱۱

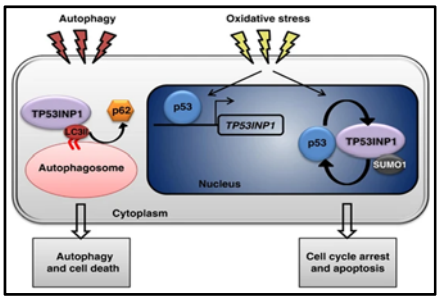
پست الکترونیک: salavati@ari.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۴۰۲/۳/۱۶

میانگین سن شروع دیابت در جهان ۴۲/۵ سال است که می‌تواند به دلایلی نظیر مصرف بالای قند و رژیم غذایی پر کالری، فعالیت بدنی کم، استعداد ژنتیکی و سبک زندگی مرتبط باشد [۵]. بر اساس پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی، تعداد افراد مبتلا به T2DM تا سال ۲۰۳۰ به ۵۷۰ میلیون و تا سال ۲۰۴۵ به ۷۰۰ میلیون افزایش خواهد یافت [۶, ۷].

این بیماری پلی‌ژنیک و چند عاملی بوده و ژن‌های متعددی در بروز آن نقش دارند که هنوز بسیاری از ژن‌های زمینه‌ساز شناخته نشده‌اند. با توجه به شیوع رو به گسترش T2DM در جهان و عوارض متعدد آن، بررسی دقیق سازوکارهای درگیر و جهش‌های ژنتیکی مرتبط، به منظور تشخیص زودهنگام و پیشگیری از ورود بیماری به مراحل پیشرفته، ضروری می‌باشد. چندشکلی‌های نوکلئوتیدی (SNP: single nucleotide polymorphism) یک منبع تنوع ژنتیکی شناخته‌شده ژنوم هستند که به عنوان نشانگر مولکولی برای پیش‌بینی و تشخیص بیماری‌هایی همچون دیابت معرفی شده‌اند. مطالعات پیشین ثابت کرده‌اند که ژن‌ها و پروتئین‌هایی که در اختلال عملکرد میتوکندری نقش دارند، تاثیر مهمی در پاتوژنز T2DM ایفا می‌نمایند. پروتئین TP53INP1 (Tumor Protein p53-Induced Nuclear Protein 1) یک سرکوبگر تومور است که پاسخ‌های p53 به استرس را میانجی‌گری می‌کند. این ژن در بین انسان و جوندگان بسیار حفاظت شده بوده و در پاسخ به تنش‌هایی

چون التهاب، بیان بالایی دارد. این پروتئین از واسطه‌های کلیدی عملکرد آنتی‌اکسیدانی p53 است که از طریق پیشبرد فعالیت رونویسی *p53* بر روی ژن‌های هدف عمل می‌کند [۸]. این پروتئین که مرگ سلولی وابسته به اتوفاژی را از طریق آپوپتوز، تنظیم چسبندگی ماتریکس سلولی و مهاجرت سلولی میانجی‌گری می‌نماید، با فعالسازی از طریق پروتئین p53 که پاسخ آسیب اکسیداتیو را تنظیم می‌کند، بیان می‌گردد. طی استرس اکسیداتیو، بیان TP53INP1 توسط p53 القا می‌شود حال اگر این استرس، اتوفاژی را برانگیزد، TP53INP1 با LC3 در سیتوپلاسم برهمکنش نموده و به اتوفاگوزوزم‌ها می‌رود تا p62 را جابجا کند و باعث مرگ سلولی مرتبط با اتوفاژی گردد. اما اگر این استرس باعث اکسیداسیون شود، تغییرات خاصی (Sumoylation) بر روی TP53INP1 رخ می‌دهد که با p53 در هسته تعامل نموده و فعالیت رونویسی *p53* را روی ژن‌های پروآپوپتوز حمایت می‌کند (شکل ۱) [۸].



شکل ۱- افزایش فعالیت p53 ناشی از استرس اکسیداتیو توسط تغییرات TP53INP1 حساس به احیا [۸]

علاوه بر این، Peuget و همکاران نشان دادند که تنظیم کننده‌های p53 مانند TP53INP1 در تعیین سرنوشت سلول بسیار مهم هستند و مکانیسم اثر سرکوب کننده تومور، آنها را فعال می‌کند [۸]. مطالعه موش‌های مهندسی ژنتیک شده در موقعیت ژن *tp53inp1* نشان داده که اختلال میتوفاژی میتوکندری‌های ناکارآمد، منبع اصلی استرس اکسیداتیو مزمن بوده و ممکن است باعث مقاومت به انسولین و افزایش استعداد ابتلا به T2DM شود. همچنین، مطالعات گسترده ارتباط ژنومی Genome-wide association study (GWAS:) ثابت کرده که جهش rs896854 در ژن *tp53inp1* نقش مهمی در بروز T2DM دارد [۸، ۹]. مطالعات انجام شده در جهان بر روی جایگاه rs896854 در ژن *tp53inp1* و ارتباط آن با دیابت بسیار اندک است و بر اساس اطلاعات موجود، تاکنون مطالعه در مورد این پلی‌مورفیسم با روش سریع و مقرون به صرفه Tetra-Primer Arms-PCR انجام نشده است. با توجه به شیوع بالای دیابت در نواحی مرکزی ایران و همچنین اهمیت این SNP در بروز T2DM، در پژوهش حاضر، ارتباط میان پلی‌مورفیسم rs896854 ژن *tp53inp1* با T2DM از طریق روش Tetra-Primer Arms-PCR در جمعیتی از شهر دلیجان ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

مطالعه مورد-شاهدی حاضر، در ۱۲۴ فرد مبتلا به دیابت نوع ۲ به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انجام گردید. حداقل حجم نمونه برای هر گروه، بر اساس فرمول کوکران، ۹۶ نفر محاسبه شد [۱۰]. افراد دیابتی از مراجعه‌کنندگان به کلینیک دیابت مرکز بهداشت و درمان شهرستان دلیجان در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ که بیماری توسط پزشک متخصص تائید شده بود، به طور تصادفی انتخاب گردیدند. همچنین گروه کنترل از افراد سالم که هیچ گونه پیشینه معیارهای ابتلا به بیماری دیابت را نداشتند انتخاب شدند. ابتلا به دیابت با معیارهای سازمان بهداشت جهانی به صورت قند خون ناشتا بالاتر از ۱۲۶ mg/dL و سطح هموگلوبین گلیکوزیله یا HbA1C که موید میانگین قند سه ماهه گذشته است، مساوی یا بالاتر از ۶/۵ در نظر گرفته شد.

خون‌گیری و استخراج DNA

از هر فرد ۳ سی‌سی خون وریدی گرفته و درون لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد و تا زمان استفاده در °C ۲۰- نگهداری گردید. استخراج DNA با روش Salting out انجام پذیرفت [۱۱]. ابتدا هر نمونه خون در فالکون ۱۵ ml ریخته و با محلول Salin ۰/۹ ٪ (Sigma, Germany) پر شد. پس از چندین بار واژگونی، به مدت ۱۵ دقیقه با ۶۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) و دمای °C ۴ سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی خارج و روی رسوب باقیمانده آب سرد ریخته و توسط سمپلر مخلوط گردید. پس از یکنواخت شدن محلول، ۱۵ دقیقه با rpm ۳۴۰۰ و دمای °C ۴ سانتریفیوژ شد. مجدد محلول رویی خارج و مرحله قبلی تکرار گردید. بر روی رسوب، ابتدا ml ۴/۵ بافر لیزکننده سرد حاوی NaCl، Tris و EDTA (Sigma, Germany) اضافه و چندین بار واژگون شد. سپس µl ۲۵۰ محلول ۱۰٪ SDS اضافه و پس از چندین بار واژگونی، *µl* ۲۵ پروتئیناز *K* اضافه گردید و در دمای °C ۵۵ به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، به اندازه ۱/۳ حجم محلول موجود درون فالکون، Nacl 6M اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای °C ۴ نگهداری شد. پس از چندین بار واژگونی، ۱۵ دقیقه با rpm ۳۴۰۰ در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. محلول رویی توسط سمپلر به فالکون دیگری منتقل و

ایزوپروپانول (DNAbiotech, Iran) سرد برابر حجم به آن اضافه شد. پس از چندین بار واژگونی، کلاف DNA ظاهر شده به میکروتیوب منتقل و ۱ml اتانل (DNAbiotech) ۷۰ درصد جهت شستشو به آن اضافه شد. پس از خروج اتانل و خشک شدن کلاف، بافر TE به آن اضافه شد تا محلول یکنواختی حاصل گردد و DNAها در دمای ۲۰- °C نگهداری شد. کیفیت DNA توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد و کمیت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید.

تعیین پلی‌مورفیسم توسط روش Tetra-Primer Arms-PCR

این روش برای مشخص نمودن جهش‌های نقطه‌ای و پلی‌مورفیسم، بسیار قدرتمند بوده و روشی ساده و اقتصادی جهت تعیین SNP است و از ۴ پرایمر در یک PCR به صورت همزمان استفاده می‌شود [۱۲]. اساس آن، مبتنی بر طراحی یک جفت پرایمر خارجی و یک جفت پرایمر داخلی اختصاصی آلل و وارد نمودن همزمان آنها در هر واکنش است. در چنین واکنشی، آنزیم DNA پلیمراز عمل پلیمریزاسیون را با استفاده از پرایمرهای داخلی، زمانی آغاز می‌کند که انتهای ´۳ پرایمر داخلی به طور دقیق، مکمل جایگاه SNP باشد [۱۳، ۱۴]. در این پژوهش توالی ژن *tp53inp1* از سایت NCBI دریافت و برای مشخص نمودن SNP در جایگاه rs896854 توسط نرم افزار GENE Runner چهار پرایمر طراحی گردید. به منظور بررسی اختصاصیت و همچنین عدم اتصال آنها و تکثیر بخش‌های غیراختصاصی ژنوم، پرایمرها توسط برنامه BLAST آنالیز شد. پرایمرهای TPOF (TP Outer Forward) و TPOR (TP Outer Reverse)، پرایمرهای خارجی بوده اما دو پرایمر TPIF (TP Inner Forward) و TPIR (TP Inner Reverse)، اختصاصی جایگاه SNP موردنظر بودند. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای بررسی پلی‌مورفیسم

Primer name	Primer sequence	Primer length	Allele
TPOF	5′TCGGGAGTCACAGTTGTAAAGAGGCTC3′	27	-
TPOR	5′ACCGAGCGCTGAGTATGTGCCATATAC3′	27	-
TPIF	5′GTGTGGCCGTGAGCAACTTAATCTCT3′	26	T
TPIR	5′ATACATAGGAAACCCGAGGCACAGG3′	25	C

روش کار به این صورت بود که در هر واکنش PCR، هر ۴ پرایمر به طور همزمان برای بررسی DNA وارد میکروتیوب PCR شد و با افزودن مقادیر مناسب آنزیم DNA پلی‌مراز، بافر (Ampliqon, Denmark) و هر مورد DNA های استخراج شده به عنوان الگو، واکنش PCR مطابق با شرایط جدول ۲ انجام گردید. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز (DNAbiotech) ۱/۵ درصد بررسی شدند.

جدول ۲- برنامه PCR برای پلی‌مورفیسم *rs896854*

تکرار	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	مرحله
۱	۴ دقیقه	۹۵	دناتوراسیون اولیه
۳۸	۳۰ ثانیه	۹۴	دناتوراسیون
	۳۰ ثانیه	۵۸/۴	اتصال
	۳۵ ثانیه	۷۲	گسترش
۳	۴ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی

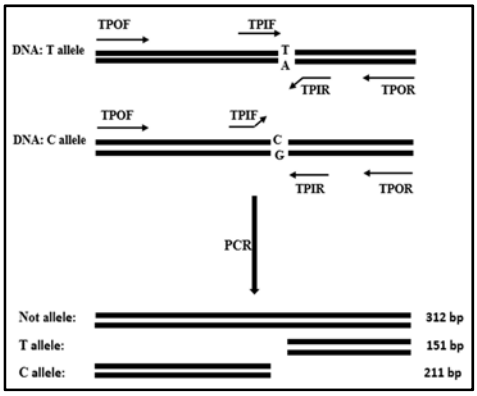
اندازه قطعاتی که توسط ۴ پرایمر برای rs896854 ژن *tp53inp1* قابل تکثیر بود به شرح ذیل بودند:

۱- قطعه تکثیری حاصل از دو پرایمر خارجی TPOF و TPOR به طول ۳۱۲ جفت باز

۲- قطعه تکثیری حاصل از پرایمر خارجی TPOF و داخلی TPIR به طول ۲۱۱ جفت باز (معرف آلل C)

۳- قطعه تکثیری حاصل از پرایمر خارجی TPOR و داخلی TPIF به طول ۱۵۴جفت باز (معرف آلل T)

در ادامه نوع SNP و تعداد آن در تمامی افراد بیمار و کنترل با روش Tetra-Primer Arms-PCR بررسی و تعیین گردید. شکل ۲ شمای کلی از روش کار PCR و قطعات حاصل در این مطالعه است.



شکل ۲- شمای کلی PCR توسط پرایمرهای طراحی شده

آنالیز آماری

بررسی و رسم نمودار فراوانی‌ها و همچنین تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام پذیرفت. برای مقایسه داده‌ها میان دو گروه بیمار و کنترل، از آزمون مربع کای استفاده و $P \leq ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

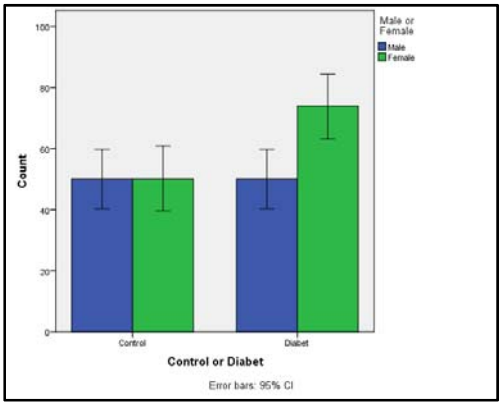
ملاحظات اخلاقی

نمونه‌گیری پس از آگاهی لازم، به صورت محرمانه و با اخذ رضایتنامه کتبی و آگاهانه انجام پذیرفت و مورد تائید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران شرق با کد IR.IAU.ET.REC.1401.004 قرار گرفت.

نتایج

نتایج نمونه‌گیری

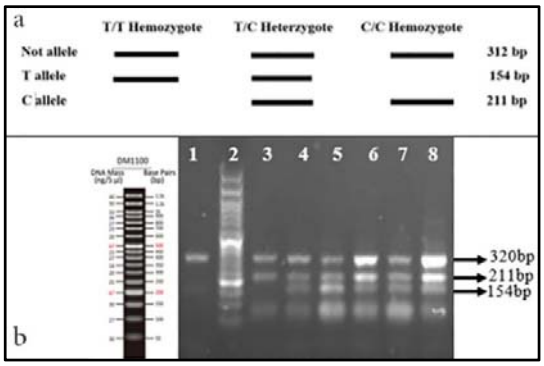
از ۱۲۴ نفر در گروه بیمار، ۵۰ نفر مرد و ۷۴ نفر زن و از ۱۰۰ نفر در گروه کنترل ۵۰ نفر مرد و ۵۰ نفر زن بودند (شکل ۳) که تفاوت معناداری بین گروه بیمار و کنترل از نظر جنسیت مشاهده نشد (P=۰/۱۴۸). همچنین میانگین سنی گروه بیمار ۵۶/۷۲ (۸۰-۳۳) سال و میانگین سنی گروه کنترل ۴۷/۷۴ (۷۹-۳۰) سال بود که تفاوت بین دو گروه، معنادار بود (P=۰/۰۰۲).



شکل ۳- مقایسه فراوانی گروه بیمار و کنترل بر اساس جنسیت

نتایج الکتروفورز حاصل از واکنش PCR

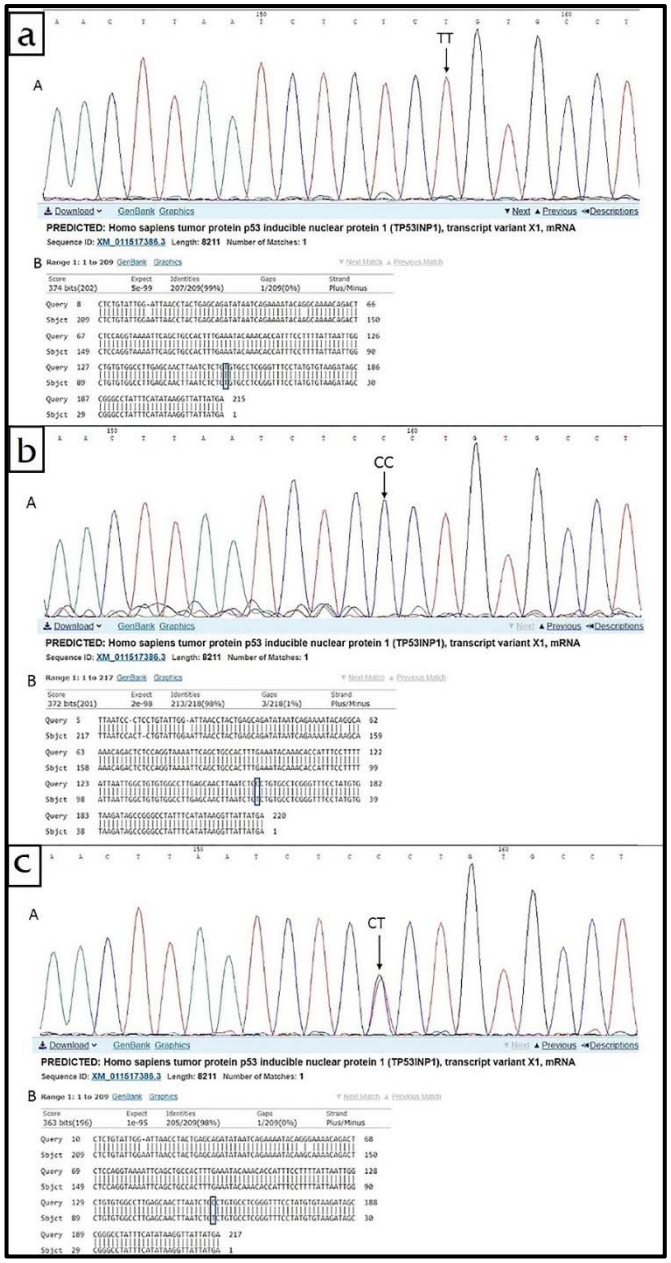
پس از تکثیر نمونه‌های DNA با پرایمرهای طراحی شده توسط تکنیک Tetra-Primer Arms-PCR، آلل‌ها و ژنوتیپ نمونه‌ها بر اساس الگوی باندها تعیین گردیدند. به این صورت که تمامی نمونه‌های دارای باند اصلی ۳۱۲ جفت باز بودند اما نمونه‌هایی که غیر از آن، باندهای داخلی ۲۱۱ و ۱۵۴ جفت باز را به صورت همزمان داشتند، ژنوتیپ TC (هتروزیگوت)، نمونه‌هایی که تنها باند داخلی ۲۱۱ جفت باز را داشتند، ژنوتیپ CC (هموزیگوت C) و نمونه‌هایی که تنها باند داخلی ۱۵۴ جفت باز را داشتند، ژنوتیپ TT (هموزیگوت T) بودند. بنابراین بر اساس الگوی باندهای مشاهده شده بر روی ژل آگارز، نوکلئوتید منطقه SNP مورد مطالعه، تعیین گردید. شکل ۴ نمای شماتیک قطعه DNAهای حاصل و نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز را نشان می‌دهد.



شکل ۴- الگوی باندهای تکثیری. a) نمای شماتیک باندهای تکثیری، b) تصویر الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک ۱: ژنوتیپ TT، چاهک ۲: 50 bp DNA Ladder، چاهک ۳: ژنوتیپ CC، چاهک‌های ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸: ژنوتیپ TC.

تعیین توالی پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1*

برای تأیید و اثبات پلی‌مورفیسم‌های تعیین شده، چند نمونه از محصولات PCR تعیین توالی (sequencing) شدند (پیشگام، ایران). سپس نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار ChromasPro ورژن ۲،۱،۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به علاوه نتایج حاصل از تعیین توالی در سایت NCBI بلاست شدند و بنابراین صحت نتایج با هر دو روش تائید شد. نتایج تعیین توالی در محل پلی‌مورفیسم مورد مطالعه در این پژوهش، در شکل ۵ آمده است.



شکل ۵- نتایج تعیین توالی پلی‌مورفیسم *rs896854* ژن *tp53inp1*. بخش‌های A: نتایج تعیین توالی، بخش‌های B: نتایج بلاست. a) ژنوتیپ TT، b) ژنوتیپ CC و c) ژنوتیپ TC.

آنالیزهای آماری نشان داد که در جایگاه *rs896854* ژن *tp53inp1*، درصد فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CC، TC به ترتیب در گروه بیمار ۱۳ درصد، ۲۹ درصد و ۵۸ درصد و در گروه کنترل ۱۲ درصد، ۱۷ درصد و ۷۱ درصد بودند. به علاوه درصد فراوانی آلل‌های T و C به ترتیب در گروه بیمار ۴۲ درصد و ۵۸ درصد و در گروه کنترل ۴۷/۵ درصد و ۵۲/۵ درصد بود. علاوه بر این، تحلیل فراوانی‌ها توسط آزمون آماری مربع کای نشان داد که پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1*، ارتباط معناداری با بروز یا استعداد ابتلا به T2DM در جمعیت مورد مطالعه نداشت (P>۰/۰۵). نتایج ذکر شده در جدول ۳ خلاصه شده است.

جدول ۳- تعداد و فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها و نتایج آزمون آماری مربع کای

افراد مورد مطالعه	تعداد و فراوانی ژنوتیپ‌ها			فراوانی آلل‌ها		آزمون مربع کای
	T/T	C/C	T/C	T	C	*P*
گروه بیمار	۱۶(۱۲/۹ ٪)	۳۶(۲۹ ٪)	۷۲(۵۸/۱ ٪)	۱۰۴(۴۱/۹ ٪)	۱۴۴(۵۸/۱ ٪)	۰/۰۸۷
گروه کنترل	۱۲(۱۲٪)	۱۷(۱۷٪)	۷۱(۷۱٪)	۹۵(۴۷/۵ ٪)	۱۰۵(۵۲/۵ ٪)	

بحث

تغییر در توالی DNA که در جمعیتی با فراوانی یک درصد یا بیشتر رخ می‌دهد، پلی‌مورفیسم نامیده می‌شود. وقوع بیشتر این نوع از تغییرات، در برخی جمعیت‌ها نشان از این است که یک پلی‌مورفیسم صرف‌نظر از مفید، خنثی یا مضر بودن، به طور طبیعی رخ می‌دهد. پلی‌مورفیسم‌ها به عنوان امضای ژنتیکی در جمعیت‌ها برای مطالعه استعداد به بروز صفات خاص، از جمله بیماری استفاده می‌شوند [۱۵, ۱۶]. در سال‌های اخیر مطالعه در پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی و ارتباط آن با استعداد ابتلا به بیماری‌ها و همچنین نقش آنها در پیشرفت بیماری‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تفاوت‌های موجود بین جمعیت‌های مختلف در مناطق SNP، در تشخیص، پیش آگهی و تعیین استعداد ابتلا به برخی بیماری‌ها حائز اهمیت می‌باشد. از این رو در این پژوهش ارتباط بین پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1* و بیماری T2DM در جمعیتی از استان مرکزی (شهر دلیجان) بررسی شد. این موضوع به تایید رسید که ژنوتیپ هموزیگوت TT و CC و هتروزیگوت TC با T2DM دارای ارتباط معناداری نیستند. بنابراین مطالعه ما عدم نقش پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1* در بیماری‌زایی افراد مبتلا به T2DM را در جمعیتی از استان مرکزی (شهر دلیجان) نشان می‌دهد. در نهایت به منظور اثبات ژنوتیپ در منطقه SNP در ژن مربوطه، تعیین توالی چند نمونه انجام شد و نتایج حاصل مورد تحلیل قرار گرفت. همچنین این نتایج در سایت NCBI بلاست شدند که در مجموع نشان‌دهنده صحت کامل نتایج بودند. در همین راستا، بررسی مطالعات پیشین انجام شده در رابطه با نقش پلی‌مورفیسم‌های مختلف در ایجاد T2DM نشان می‌دهند که بسیاری از جهش‌ها از جمله پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1* در ایجاد این بیماری نقش دارند. این مطالعات با تکنیک‌های آزمایشگاهی متفاوت و در کشورهای مختلف انجام گرفته است که در برخی از آنها نتایج مشابه با نتایج مطالعه حاضر گزارش شده و نتایج برخی دیگر متفاوت بوده است. Andersen و همکاران، به بررسی ارتباط چند ژن مرتبط با T2DM که مستعد ابتلا به دیابت خودایمنی بزرگسالان هستند، پرداختند. در این مطالعه ۴۱ نوع ژن مرتبط با T2DM در بیماران فنلاندی و سوئدی بررسی شد که بر اساس نتایج آنان مشخص گردید که برخی از ژن‌های مرتبط با T2DM نیز مسئول استعداد ابتلا به دیابت خودایمنی پنهان بزرگسالان (*LADA*) هستند و این ارتباط در بیماران *LADA* با سطوح پایین اتوآنتی بادی‌های *GAD* (*GADA*) بسیار قوی است. همچنین نتایج نشان داد که پلی‌مورفیسم *rs7903146* در ژن *Tcf7l2* با *LADA* و در مقابل، پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1* با *GADA* قوی‌ترین ارتباط را دارد [۱۷]. در مطالعه حاضر مشابه با تحقیق Andersen و همکاران، ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1* با T2DM یافت نشد، اما تحقیق Andersen و همکاران نشان داد که پلی‌مورفیسم *rs896854* در *tp53inp1* یکی از پلی‌مورفیسم‌های مرتبط با T2DM است که با *GADA* ارتباطی قوی دارد [۱۷]. Wang و همکاران، به بررسی ارتباط بین بیماری آلزایمر و T2DM از طریق ژن‌های مشترک جدید شناسایی شده پرداختند. T2DM و بیماری آلزایمر، معمولاً در جمعیت‌های مسن رخ می‌دهند که T2DM به عنوان یک عامل خطر مهم برای بروز آلزایمر در نظر گرفته شده است. تجزیه و تحلیل نتایج، ۸ پلی‌مورفیسم مشترک را برای هر دو بیماری آلزایمر و T2DM شناسایی کرد. علاوه بر این، از میان ۸ پلی‌مورفیسم که در ۶ ژن مختلف قرار داشتند، ۳ ژن *tp53inp1*، *Tomm40* و *C8orf38* مربوط به اختلال عملکرد میتوکندری بودند که به شدت در استرس اکسیداتیو نقش داشته و به طور بالقوه به بروز T2DM و آلزایمر مرتبط بودند. پلی‌مورفیسم‌های این ۳ ژن به ترتیب *rs896854*، *rs7812465*، *rs6982393* بودند. بنابراین مطالعه مذکور ثابت کرد که پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1* در استعداد ابتلا به دو بیماری T2DM و آلزایمر دخیل است [۱۸]. در مطالعه حاضر برخلاف تحقیق Wang و همکاران هیچ ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم rs896854 در ژن *tp53inp1* در افراد مورد مطالعه گزارش نشد که تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و یا حتی کوچک بودن جمعیت مورد مطالعه می‌تواند دلیل این تفاوت باشد. در سال ۲۰۱۸، Liu و همکاران طی مطالعه‌ای به بررسی ارتباط ۴۸ جایگاه حساس به T2DM با سطح گلوکز و لیپید پلاسما ناشتا در شهر هانس در چین پرداختند. نتایج حاکی از ارتباط آلل T در پلی‌مورفیسم *rs896854* ژن *tp53inp1* با افزایش سطح

تری‌گلیسیرید و کاهش سطح کلسترول لیپوپروتئین با چگالی بالا بود. همچنین این متاآنالیز تأیید کرد که پلی‌مورفیسم *rs896854* در ژن *tp53inp1* با خطر *T2DM* مرتبط است [۲۰]. علاوه بر این در مطالعه Seiller و همکاران، مشخص شد که موش‌های فاقد ژن *tp53inp1*، مستعد ابتلاء به چاقی بوده و در نتیجه، متعاقب چاقی، مقاومت به انسولین ایجاد گردیده است. همچنین مشخص شد که در سلول‌های دارای نقص در ژن *tp53inp1*، به دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و اختلال میتوفاژی میتوکندری‌های ناکارآمد، استرس اکسیداتیو مزمن ایجاد شده و منجر به افزایش استعداد ابتلا به دیابت شده است [۱۹]. در مجموع مطالعه ذکر شده نشان داد که پلی‌مورفیسم rs896854 در ژن *tp53inp1* با جهش نقطه‌ای TC، با دیابت خودایمنی پنهانی بزرگسالان، بیماری آلزایمر و افزایش چربی رابطه مستقیم دارد [۲۰]. با توجه به تفاوت ذخایر ژنتیکی در مناطق مختلف، ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم با دیابت نوع ۲ در گروه مورد مطالعه شهر دلیجان یافت نشد. بر اساس دانش ما، نتایج این پژوهش برای اولین بار در جمعیت ایرانی گزارش شده است و با نتایج مطالعات پیشین تفاوت دارد که تنوع ژنتیکی گروه‌های نژادی ممکن است دلیل این تفاوت باشد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش یک روش تشخیصی سریع و مقرون به صرفه، برای تشخیص جهش TC rs896854 در ژن *tp53inp1* ارایه شد که در تمامی آزمایشگاه‌ها برای تشخیص این SNP قابل استفاده است. همچنین مشخص شد که در جمعیتی از استان مرکزی (شهر دلیجان) وجود آلل T یا C در جایگاه rs896854 در ژن *tp53inp1*، با احتمال ابتلا به دیابت نوع ۲ ارتباط معنی‌داری ندارد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر حاصل پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد نیلوفر زاهدیان است. محققان مراتب قدردانی خود را از کارکنان شبکه بهداشت و درمان شهرستان دلیجان به جهت جمع‌آوری نمونه‌های خون به‌ویژه سرکار خانم رفیعی و همچنین پژوهشگاه هوافضا برای فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی اعلام می‌دارند. منابع مالی توسط نویسندگان تامین شده است.

References:

[1] Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. ***Nature*** 2019;576(7785):51-60.
[2] Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. ***Int J Molecular Sci*** 2020; 21(17): 6275.
[3] Asiimwe D, Mauti GO, Kiconco R. Prevalence and risk factors associated with type 2 diabetes in elderly patients aged 45-80 years at Kanungu District. ***J Diabetes Res*** 2020; 2020: 1-5.
[4] Hajilo N, Nezhadali M, Ghanei L. Association of adiponectin gene rs2241766 polymorphism with serum adiponectin level, Insulin resistance and type 2 diabetes mellitus in an Iranian population. 2019.
[5] Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological perspectives of diabetes. ***Cell Biochem Biophysics*** 2015; 73(1): 181-5.
[6] Dehesh T, Dehesh P, Shojaei S. Prevalence and associated factors of anxiety and depression among patients with Type 2 diabetes in Kerman, Southern Iran. ***Diabetes Metab Syndr Obes*** 2020; 13: 1509.
[7] Christodoulou M-I, Avgeris M, Kokkinopoulou I, Maratou E, Mitrou P, Kontos CK, et al. Blood-based analysis of type-2 diabetes mellitus susceptibility genes identifies specific transcript variants with deregulated expression and association with disease risk. ***Sci Reports*** 2019;9(1):1-14.
[8] Peuget S, Bonacci T, Soubeyran P, Iovanna J, Dusetti NJ. Oxidative stress-induced p53 activity is enhanced by a redox-sensitive TP53INP1 SUMOylation. ***Cell Death Differ*** 2014; 21(7): 1107-18.
[9] Cui B, Zhu X, Xu M, Guo T, Zhu D, Chen G, et al. A genome-wide association study confirms previously reported loci for type 2 diabetes in Han Chinese. ***PloS One*** 2011; 6(7): e22353.
[10] Siasi Torbati E, Tavakkoli N, Amini K. Study of association between rs7975232 polymorphism in vitamin D receptor gene and periodontitis by Tetra Arms PCR. ***J Dental Med*** 2021; 33(4): 227-39.
[11] Miller S, DD D. Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. ***Nucleic Acids Res*** 1988;16(3):1215.
[12] Linjawi S, Al-Gaithy Z, Sindi S, Hamdi N, Linjawi A, Alrofidi A. Tetra-primer ARMS PCR as an efficient alternative for SNPs detection in molecular diagnostic: A comparison study. ***Eur J Pharm Med Res*** 2019; 6: 91-6.
[13] Mesrian Tanha H, Mojtabavi Naeini M, Rahgozar S, Rasa SMM, Vallian S. Modified tetra-primer ARMS PCR as a single-nucleotide polymorphism genotyping tool. ***Genetic Testing Molecular Biomarkers*** 2015; 19(3): 156-61.
[14] Linjawi S, Al-Gaithy Z, Sindi S, Hamdi N, Linjawi A, Alrofidi A. Tetra-primer ARMS PCR as an efficient alternative for SNPs detection in molecular diagnostic: a comparison study. ***EJPMR*** 2019; 6: 91-6.
[15] Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era

of personal genomics. ***BMC Med Genomics*** 2015; 8(1): 1-7.
[16] Tian XP, Ma SY, Young KH, Ong CK, Liu YH, Li ZH, et al. A composite single-nucleotide polymorphism prediction signature for extranodal natural killer/T-cell lymphoma. ***Blood*** 2021; 138(6): 452.
[17] Andersen MK, Sterner M, Forsén T, Käräjämäki A, Rolandsson O, Forsblom C, et al. Type 2 diabetes susceptibility gene variants predispose to adult-onset autoimmune diabetes. ***Diabetologia*** 2014; 57(9): 1859-68.
[18] Wang XF, Lin X, Li DY, Zhou R, Greenbaum J, Chen YC, et al. Linking Alzheimer's disease and type 2 diabetes: Novel shared susceptibility genes detected by cFDR approach. ***J Neurological Sci*** 2017; 380: 262-72.
[19] Seillier M, Pouyet L, N'Guessan P, Nollet M, Capo F, Guillaumond F, et al. Defects in mitophagy promote redox-driven metabolic syndrome in the absence of TP 53 INP 1. ***EMBO Molecular Med*** 2015; 7(6): 802-18.
[20] Liu J, Wang L, Qian Y, Dai J, Shen C, Jin G, et al. Association of 48 type 2 diabetes susceptibility loci with fasting plasma glucose and lipid levels in Chinese Hans. ***Diabetes Res Clin Practice*** 2018; 139: 114-21.