Feyz Medical Sciences Journal
2023, Volume 27, Issue 5
Pages: 539-547
Doi: 10.48307/FMSJ.2023.0.5.541
Original Article

Association of rs2075650 polymorphism of tomm40 gene with type 2 diabetes in Dilijan city, Iran

Maryam Salavatifar [1*], Parya Ahmadzadeh Irandoust [2], Franak Jamshidain[2]

[1] Department of Aerospace Physiology, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, East Tehran Branch (Ghiamdasht), Islamic Azad University, Tehran, Iran

[*]**Corresponding author:** Maryam Salavati-Far, Department of Aerospace Physiology, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran
Email: salavati@ari.ac.ir

Received: 3 September 2023 **Revised:** 13 November 2023 **Accepted:** 13 November 2023

Abstract

Background and Aim: The tomm40 gene encodes the Tomm40 protein, which is a translocase in the mitochondrial outer membrane. Changes in the tomm40 gene can lead to mitochondrial dysfunction. In this study, the association between rs2075650 polymorphism of the tomm40 gene and the possibility of type 2 diabetes was investigated.

Methods: In this study, blood was collected from 101 healthy people and 119 people with type 2 diabetes, and the DNA of the samples was extracted by salting out method. After designing the primer according to Tetra-Primer Arms method, PCR test was performed and polymorphism results were observed on agarose gel.

Results: The frequencies of AA, AG and GG genotypes were 14.28%, 80.67% and 5.05% in the patient group and 15.84%, 81.18% and 2.98% in the control group, respectively. Also, the frequencies of A and G alleles were calculated as 54% and 46% in the patient group and 56% and 44% in the control group, respectively. The statistical analysis showed that the rs2075650 polymorphism of the tomm40 gene has no significant association with the risk of type 2 diabetes in the studied population ($P<0.05$).

Conclusion: The rs2075650 polymorphism of the tomm40 gene was not related to the possibility of type 2 diabetes in the studied population. It is suggested to conduct more studies in populations with a large sample size to confirm the findings.

Keywords: Diabetes, Polymorphism, Single Nucleotide, *tomm40*

Copyright© 2023. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: http://feyz.kaums.ac.ir/

مجله علوم پزشکی فیض
دوره ۲۷، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۲
صفحات: ۵۴۷-۵۳۹
Doi: 10.48307/FMSJ.2023.0.5.541
اصیل پژوهشی

همراهی پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن *tomm40* با بیماری دیابت نوع ۲ در شهر دلیجان

مریم صلواتی فر[1*]، پریا احمدزاده ایراندوست[2]، فرانک جمشیدیان[2]

[1]پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران
[2]گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲ **اصلاح مقاله:** ۱۴۰۲/۰۸/۲۲ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۲/۰۸/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: ژن tomm40 کدکننده پروتئین Tomm40 است که یک ترانسلوکاز در غشای خارجی میتوکندری می‌باشد. تغییرات در ژن tomm40 می‌تواند منجر به اختلال عملکرد میتوکندری شود. در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم rs2075650 در ژن tomm40 و امکان ابتلا به دیابت نوع ۲ بررسی گردید.

روش‌ها: در مطالعه حاضر، از ۱۰۱ فرد سالم و ۱۱۹ فرد مبتلا به دیابت نوع ۲ خونگیری انجام شد و DNA نمونه‌ها با روش Salting out استخراج گردید. پس از طراحی پرایمر طبق روش Tetra-Primer Arms، تست PCR انجام و نتایج پلی‌مورفیسم بر روی ژل اگارز مشاهده گردید.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AG و GG به‌ترتیب در گروه بیمار ۱۴/۲۸٪، ۸۰/۶۷٪ و ۵/۰۵٪ و در گروه کنترل ۱۵/۸۴٪، ۸۱/۱۸٪ و ۲/۹۸٪ بودند. همچنین فراوانی آلل‌های A و G به‌ترتیب در گروه بیمار ۵۴٪ و ۴۶٪ و در گروه کنترل ۵۶٪ و ۴۴٪ محاسبه شدند. تحلیل آماری یافته‌ها نشان داد که پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40، ارتباط معناداری با خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیت مورد مطالعه ندارد ($P>0/05$).

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40 با امکان ابتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیت مورد مطالعه ارتباطی نداشت. انجام مطالعات بیشتر در جمعیت‌های با حجم نمونه بالا برای تایید یافته‌ها پیشنهاد می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: دیابت، پلی‌مورفیسم، تک نوکلئوتید، tomm40

*نویسنده مسئول: **مریم صلواتی فر** پست الکترونیک: salavati@ari.ac.ir
آدرس: پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

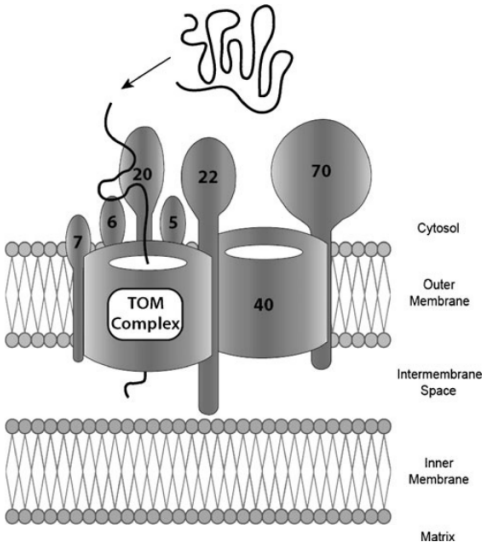
مقدمه

دیابت یک اختلال چند عاملی است که به دلیل ترکیبی از کاهش ترشح انسولین و اختلال در پاسخ‌گویی سلول‌های هدف ایجاد می‌شود. از عوارض شایع پاتولوژیک دیابت می‌توان به عوارض قلبی-عروقی، نفروپاتی و رتینوپاتی اشاره کرد. دو نوع اصلی این بیماری، دیابت نوع ۱ و نوع ۲ هستند که حدود ۹۰ درصد از موارد ابتلا، مربوط به دیابت نوع ۲ است [۱،۲]. از عوامل خطر ابتلا به دیابت می‌توان به سبک زندگی، چاقی، ژنتیک و چندین عامل دیگر از جمله اختلال در عملکرد میتوکندری اشاره کرد. با پیشرفت و مزمن شدن بیماری، انسولین قادر به حفظ هموستاز نیست و در نتیجه هایپرگلایسمی ایجاد می‌شود [۱].

بر اساس پیش بینی سازمان بهداشت جهانی، انتظار می‌رود تا سال ۲۰۴۵ در حدود ۶۹۳ میلیون نفر در جهان مبتلا به دیابت باشند که کشورهای در حال توسعه در معرض خطر بالاتری هستند [۳]. با توجه به شیوع بالای این بیماری و نقش وراثت در بروز آن، بررسی دقیق جهش‌های ژنتیکی دخیل با هدف تشخیص زودهنگام و پیشگیری از ورود بیماری به مراحل پیشرفته ضروری به نظر می‌رسد.

چندشکلی‌های نوکلئوتیدی (SNP: Single Nucleotide Polymorphism)، پلی‌مورفیسم‌های ناشی از جهش‌های نقطه‌ای هستند که باعث ایجاد آلل‌های مختلف حاوی بازهای جایگزین در موقعیت نوکلئوتیدی معین در یک مکان می‌شوند [۴]. از لحاظ ژنتیکی، پلی‌مورفیسم‌های مختلفی در بروز بیماری دیابت نوع ۲ شناسایی شده‌اند. مطالعات ثابت نموده که تغییرات در ژن‌ها و پروتئین‌هایی که در عملکرد میتوکندری نقش دارند، تاثیر به سزایی در پاتوژنز دیابت نوع ۲ ایفا می‌کنند. در این زمینه ژن‌های متعددی شناسایی شده‌اند که یکی از آنها ژن tomm40 است. این ژن بر روی کروموزوم ۱۹ در موقعیت 19q13.2 قرار داشته و کدکننده پروتئین TOMM40 (translocase of the outer membrane) یکی از زیرواحدهای ضروری تشکیل دهنده کانال کمپلکس TOM در غشا خارجی میتوکندری است [شکل ۱] و برای انتقال پروتئین موردنیاز می‌باشد [۵،۶]. تغییر در ژن tomm40 می‌تواند منجر به اختلال عملکرد میتوکندری شود. مطالعات نشان می‌دهد که میتوکندری نقش مهمی در تنظیم مرگ و بقای سلولی، متابولیسم، تولید انرژی و آپوپتوز دارد. از طرفی اختلال عملکرد میتوکندری نقش مهمی در افزایش استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند که مسیر انسولین را مسدود کرده و مقاومت به انسولین را القا می‌کند [۷].

مطالعات گسترده ارتباطی ژنوم (GWAS: Genome-wide association study) ثابت نموده که جهش rs2075650 در ژن tomm40 نقش مهمی در بروز دیابت نوع ۲ دارد [۸،۹]. مطالعات انجام پذیرفته در جهان بر روی جایگاه rs2075650 در ژن tomm40 و ارتباط آن با دیابت اندک است و بر اساس دانش موجود، در مورد ارتباط این پلی‌مورفیسم با بیماری دیابت در ایران مطالعه‌ای انجام نشده است. با توجه به شیوع بالای دیابت در نواحی مرکزی ایران و همچنین اهمیت SNP مذکور در بروز دیابت نوع ۲، در این مطالعه ارتباط میان پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40 با دیابت نوع ۲ در جمعیتی از شهر دلیجان از طریق روش Tetra-Primer Arms-PCR، بررسی گردید.



شکل ۱. کمپلکس پروتئینی TOM و اجزاء تشکیل دهند آن در غشاء خارجی میتوکندری [۶]

روش‌ها

اطلاعات بیماران

در این پژوهش موردی شاهدی، ۱۱۹ فرد مبتلا به دیابت نوع ۲ به عنوان گروه مورد و ۱۰۱ فرد سالم بدون سابقه دیابت به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. حجم نمونه براساس فرمول کوکران محاسبه گردید. در این محاسبه با سطح خطای ۰/۱، حداقل ۹۶ نفر در هر گروه تخمین زده شد.

حداقل تعداد نمونه =n

N= تعداد جمعیت

p= درصد توزیع صفت در جامعه

q= 1-p

z= ۱/۹۶

d= ضریب خطا (۰/۰۵)

$$n = \frac{\frac{z^2pq}{d^2}}{1+\frac{1}{N}\left[\frac{z^2pq}{d^2}-1\right]}$$

افراد به صورت تصادفی از مراجعین برای چکاپ سالیانه به مرکز بهداشت شهرستان دلیجان در استان مرکزی انتخاب گردیدند. ملاک انتخاب گروه مورد، بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی به صورت قند خون ناشتا بالاتر از ۱۲۶mg/dL و سطح هموگلوبین گلیکوزیله یا HbA1C مساوی ۶/۵ یا بالاتر در نظر گرفته شد. ملاک انتخاب گروه شاهد به صورت قند خون ناشتا پایین تر از۹۵ mg/dL و سطح هموگلوبین گلیکوزیله یا HbA1C کمتر از ۵/۵ در نظر گرفته شد.

خون‌گیری و استخراج DNA

سه میلی‌لیتر خون وریدی از هر فرد اخذ شد و در لوله‌های درپوش‌دار حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ریخته و تا زمان استفاده، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. برای استخراج DNA از لنفوسیت‌های خون محیطی، از روش Salting out استفاده شد [۱۰]. ابتدا بر روی هر نمونه خون، محلول سالین ۰/۹٪ (Sigma, Germany) (۰/۹ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب) ریخته شد و پس از واژگونی، به مدت ۱۵ دقیقه با ۶۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی خارج و روی رسوب باقیمانده آب سرد ریخته و پس از یکنواخت شدن محلول، ۱۵ دقیقه با ۳۴۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مجدد محلول رویی خارج و مرحله قبلی تکرار گردید. بر روی رسوب ابتدا ۴/۵ سی‌سی بافر لیز کننده سرد حاوی NaCl (۱۵۰ میلی مولار)، Tris (۱۰ میلی مولار) و EDTA (۱۰ میلی مولار) (Sigma, Germany) اضافه و چندین بار واژگون گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۱۰٪ SDS (۱۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب) اضافه و پس از چندین بار واژگونی، ۲۵ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، به اندازه ۱/۳ حجم محلول موجود درون فالکون، 6M NaCl اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از چندین بار واژگونی، ۱۵ دقیقه با ۳۴۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. محلول رویی توسط سمپلر به فالکون دیگری منتقل و ایزوپروپانول (DNAbiotech, Iran) به آن اضافه شد. کلاف DNA ظاهر شده به میکروتیوب منتقل و با اتانل ۷۰٪ (DNAbiotech) شستشو داده شد. پس از خشک شدن کلاف، بافر TE به آن اضافه شد تا محلول یکنواختی حاصل گردد و DNAها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کیفیت DNA توسط ژل آگارز ۲ درصد و کمیت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی گردید.

تعیین ژنوتیپ

برای تعیین ژنوتیپ در منطقه موردنظر، از روش قدرتمند و مقرون به صرفه Tetra-Primer Arms-PCR استفاده گردید [۱۱]. به این منظور بر اساس توالی ژن tomm40، که از سایت NCBI دریافت گردید، ۴ پرایمر اختصاصی توسط نرم افزار GENE Runner طراحی شد که یک جفت پرایمر خارجی و یک جفت پرایمر داخلی اختصاصی منطقه SNP موردنظر بودند. برای تایید اتصال دقیق و همچنین عدم اتصال تکثیر سایر بخش‌های ژنوم، پرایمرها توسط برنامه BLAST سایت NCBI آنالیز شدند. هر ۴ پرایمر به صورت همزمان وارد واکنش PCR گردیدند. در چنین واکنشی، آنزیم DNA پلیمراز عمل پلی‌مریزاسیون را با استفاده از پرایمرهای داخلی، در صورت مکمل بودن دقیق انتهای ۳′ پرایمر داخلی با جایگاه SNP انجام می‌دهد [۱۲،۱۳]. پرایمرهای TOMMOF (TOMM Outer Forward) و TOMMOR (TOMM Outer Reverse)، پرایمرهای خارجی بودند. پرایمرهای داخلی TOMMIF (TOMM Inner Forward) و TOMMIR (TOMM Inner Reverse)، اختصاصی جایگاه SNP مورد نظر بودند. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای بررسی پلی‌مورفیسم

Primer name	Primer sequence	Primer length	Allele
TOMMOF	5′GATCGCAGCCTGGAGCAATTAGAGTAG 3′	27	-
TOMMOR	5′TTGAGTGAGGAGTAATTGGGCCGAG 3′	25	-
TOMMIF	5′AGATGAGAGTTGGTGTGGGGTTTGG 3′	25	G
TOMMIR	5′GAAGAGAAACGCTGTCACACTCCCCT 3′	26	A

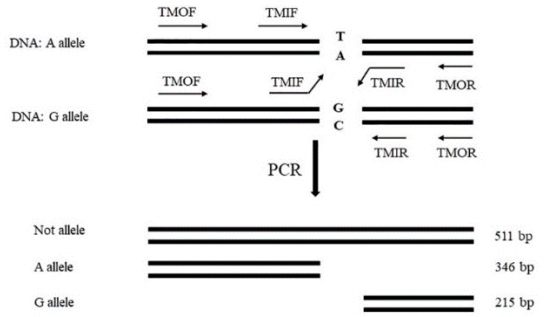
اندازه قطعات قابل تکثیر توسط ۴ پرایمر برای rs2075650 ژن tomm40 به قرار زیر بودند:

۱- قطعه تکثیری حاصل از دو پرایمر خارجی TOMMOF و TOMMOR به طول ۵۱۱ جفت باز

۲- قطعه تکثیری حاصل از پرایمر خارجی TOMMOR و داخلی TOMMIF به طول ۲۱۵ جفت باز (معرف آلل G)

۳- قطعه تکثیری حاصل از پرایمر خارجی TOMMOF و داخلی TOMMIR به طول ۳۴۶ جفت باز (معرف آلل A)

شکل ۲ تصویر شماتیک روش کار PCR و قطعات حاصل در این مطالعه می‌باشد.



شکل ۲. تصویر شماتیک PCR با پرایمرهای طراحی شده

در ادامه نوع SNP در تمامی افراد مورد مطالعه با روش Tetra-Primer Arms-PCR بررسی و تعیین گردید. روند کار به این صورت بود که هر ۴ پرایمر به طور همزمان وارد هر واکنش شده و با افزودن آنزیم DNA پلی‌مراز، بافر (Ampliqon, Denmark) و DNA مربوطه به عنوان الگو، تکثیر انجام شد [جدول ۲]. برنامه واکنش PCR به شرح جدول ۳ انجام شد. پس

از اتمام کامل واکنش PCR، محصول هر واکنش بر روی ژل آگارز ۲ درصد (DNAbiotech) بارگذاری و زیر نور UV مشاهده شد.

جدول ۲. ترکیبات موردنیاز واکنشTetra-Primer Arms-PCR

Materials	Amount
Injection Water	۵/۷ µl
2X Master Mix	۱۰ µl
TOMMOF Primer (2 pmol)	۰/۷ µl
TOMMOR Primer (2 pmol)	۰/۷ µl
TOMMIF Primer (2 pmol)	۰/۷ µl
TOMMIR Primer (2 pmol)	۰/۷ µl
DNA (With a certain dilution)	۱/۵ µl
Total	۲۰ µl

جدول ۳. برنامه طراحی شده PCR برای پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40

سیکل	زمان	دما
۱	۴ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
۳۸	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
	۳۰ ثانیه	۵۷ درجه سانتی‌گراد
	۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد
۳	۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی و رسم نمودار فراوانی‌ها و همچنین تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار آماری SPSS ورژن ۲۰ انجام شد. از آزمون مربع کای برای مقایسه نتایج کیفی و از آزمون T مستقل برای مقایسه موارد کمی استفاده شد و P≤۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

نمونه‌گیری به صورت محرمانه، پس از اخذ رضایت نامه کتبی آگاهی انجام شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران شرق، با کد IR.IAU.ET.REC.1401.023 مورد تایید قرار گرفت.

نتایج

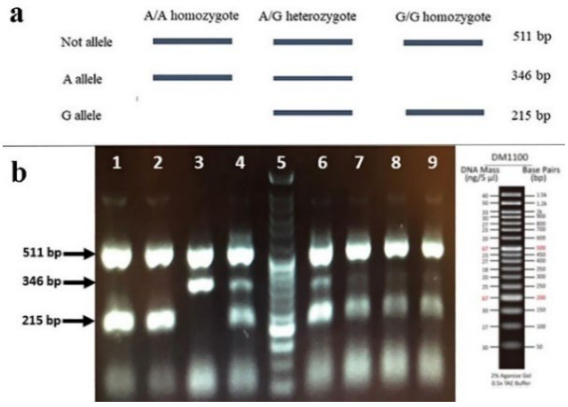
از ۱۱۹ فرد گروه بیمار، ۴۸ نفر مرد و ۷۱ نفر زن بودند و از ۱۰۱ فرد گروه کنترل ۳۴ نفر مرد و ۶۷ نفر زن بودند. بر اساس جدول ۴، تفاوت درصد جنسیت و میانگین سن میان دو گروه بیمار و کنترل از نظر آماری معنی دار نبود اما تفاوت بین میزان قند خون ناشتا و HbA1C در دو گروه بیمار و کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود.

جدول ۴. مقایسه فراوانی جنسیت، میانگین سن، قند خون ناشتا و میزان HbA1C در دو گروه بیمار و کنترل

متغیر		گروه بیمار	گروه کنترل	P value
جنس	مرد	۴۸(۵۸/۵ ٪)	۳۴(۴۱/۵ ٪)	(X2 test) ۰/۳۰۸
	زن	۷۱(۵۱/۴ ٪)	۶۷(۴۸/۶ ٪)	
سن		۵۹/۷±۱۰/۷	۵۴/۲±۱۲/۱	(T test) ۰/۳۴۴
قند خون ناشتا		۱۶۹/۴±۵۸/۹	۹۲/۹±۱۰/۳	(T test) ۰/ ۰۰۱
HbA1C		۸/۲±۱/۵	۵/۳±۰/۳	(T test) ۰/ ۰۰۱

نتایج تعیین ژنوتیپ

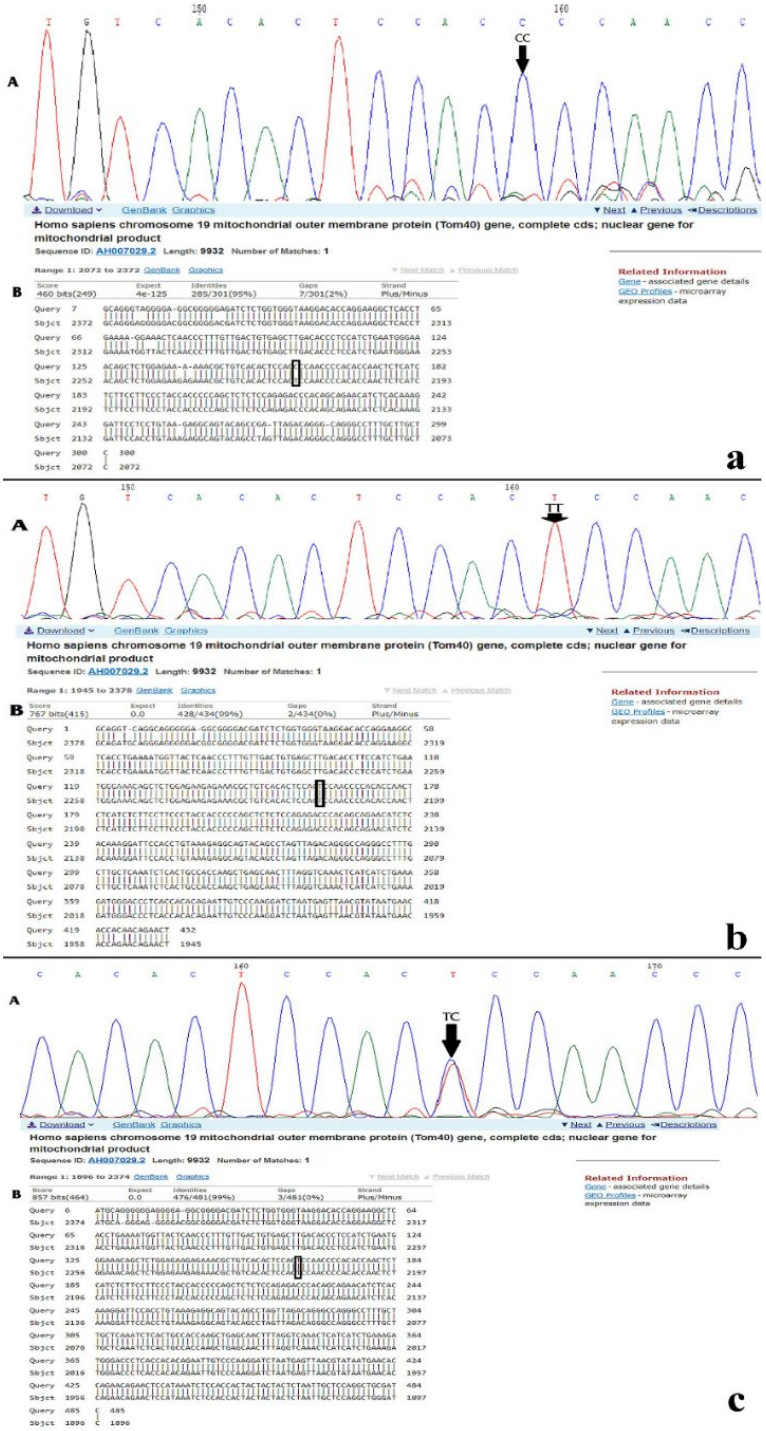
پس از استخراج DNA و تکثیر هر نمونه با روش Tetra-Primer Arms-PCR، نتایج الکتروفورز، نوع آلل منطقه SNP هر فرد را مشخص نمود. شکل ۳ نتایج مربوط به چند نمونه را نشان می‌دهد. به این صورت که تمامی نمونه‌ها دارای باند اصلی ۵۱۱ جفت باز بودند اما نمونه‌هایی که غیر از آن، باندهای داخلی ۲۱۵ و ۳۴۶ جفت باز را به صورت همزمان داشتند، ژنوتیپ AG (هتروزیگوت)، نمونه‌هایی که تنها باند داخلی ۲۱۵ جفت باز را داشتند، ژنوتیپ GG (هموزیگوت G) و نمونه‌هایی که تنها باند داخلی ۳۴۶ جفت باز را داشتند، ژنوتیپ AA (هموزیگوت A) بودند. بنابراین بر اساس الگوی باندهای مشاهده شده بر روی ژل آگارز، نوکلئوتید منطقه SNP مورد مطالعه، تعیین گردید. شکل ۳ نمای شماتیک قطعه DNAهای حاصل و نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز را نشان می‌دهد.



شکل ۳. الگوی باندهای تکثیری. a) نمای شماتیک باندهای تکثیری و ژنوتیپ‌های مربوطه، b) تصویر الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک‌های ۱ و ۲: ژنوتیپ هموزیگوت GG، چاهک ۳: ژنوتیپ هموزیگوت AA، چاهک ۴، ۶، ۷، ۸ و۹: ژنوتیپ هتروزیگوت AG و چاهک ۵: 50 bp DNA Ladder.

نتایج تعیین ژنوتیپ

به منظور تأیید و اثبات پلی‌مورفیسم‌های تعیین شده، چند نمونه از محصولات PCR تعیین توالی (sequencing) شدند (پیشگام، ایران). سپس نتایج حاصل 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. به دلیل اینکه در آزمون تعیین توالی از پرایمر داخلی reverse استفاده گردید، نمونه‌هایی که هموزیگوت CC خوانش شدند، نمایانگر توالی هموزیگوت GG در نقطه SNP بودند. به‌صورت مشابه، نمونه‌هایی که هموزیگوت TT خوانش شدند، نمایانگر توالی هموزیگوت AA در نقطه SNP و نمونه‌هایی که هتروزیگوت TC خوانش شدند، نمایانگر توالی هتروزیگوت AG در نقطه SNP بودند. نتایج تعیین توالی در محل پلی‌مورفیسم مورد مطالعه در این پژوهش، در شکل ۴ آمده است.



شکل ۴. نتایج تعیین توالی پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن *tomm40* از جهت reverse. بخش‌های A: نتایج تعیین توالی، بخش‌های B: نتایج بلاست. a) ژنوتیپ CC (ژنوتیپ GG در رشته forward) ، b) ژنوتیپ TT (ژنوتیپ هموزیگوت AA در رشته forward) و c) ژنوتیپ TC (ژنوتیپ هتروزیگوت AG در رشته forward)

همان‌گونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود بررسی‌های آماری نشان دادند که در جایگاه rs2075650 ژن tomm40، فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AG و GG به ترتیب در گروه بیمار ۱۴/۲۸٪، ۸۰/۶۷٪ و ۵/۰۵٪ و در گروه کنترل ۱۵/۸۴٪، ۸۱/۱۸٪ و ۲/۹۸٪ بودند. به علاوه فراوانی آلل‌های A و G به ترتیب در گروه بیمار ۵۴٪ و ۴۶٪ و در گروه کنترل ۵۶٪ و ۴۴٪ محاسبه شدند. تحلیل فراوانی‌ها توسط آزمون آماری مربع کای نشان داد که پلی‌مورفیسم rs2075650 در ژن tomm40، ارتباط معناداری با بروز و یا امکان ابتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیت مورد مطالعه نداشت ($P>۰/۰۵$).

جدول ۵. تعداد و فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها و نتایج آزمون مربع کای

		گروه بیمار	گروه کنترل	P value
ژنوتیپ	A/A	۱۷ (۱۴/۲۸ ٪)	۱۶ (۱۵/۸۴ ٪)	۰/۷۱۸
	A/G	۹۶ (۸۰/۶۷ ٪)	۸۲ (۸۱/۱۸ ٪)	
	G/G	۶(۵/۰۵ ٪)	۳ (۲/۹۸ ٪)	
آلل	A	۱۳۰ (۰/۵۴)	۱۱۴ (۰/۵۶)	۰/۷۰۳
	G	۱۰۸ (۰/۴۶)	۸۸ (۰/۴۴)	

بحث

در سال‌های اخیر مطالعه پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی و ارتباط آنها با میزان ابتلا و توسعه بیماری‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته است. به علاوه پلی مورفیسم‌ها در تشخیص، پیش آگهی و تعیین امکان ابتلا به برخی بیماری‌ها حائز اهمیت می‌باشند. منظور از پلی‌مورفیسم، تغییر توالی DNA است که در جمعیتی، با فراوانی یک درصد یا بیشتر رخ می‌دهد. در برخی جمعیت‌ها وقوع پلی-مورفیسم، نشان آن است که یک پلی‌مورفیسم صرف‌نظر از مفید، خنثی یا مضر بودن، به صورت خودبه‌خود رخ می‌دهد. در واقع پلی-مورفیسم‌ها به عنوان امضای ژنتیکی افراد در امکان بروز صفات خاص، از جمله برخی بیماری‌ها استفاده می‌شوند. با توجه به محدود بودن آزمون‌های تشخیص اکثر بیماری‌های متابولیک به ویژه دیابت پیش از شروع علائم، روش‌های تشخیصی ژنتیکی از جمله بررسی پلی مورفیسم‌ها می‌تواند در حوزه بهداشت و درمان بسیار کارامد باشند [۱۴،۱۵].

مجموعه پروتئینی کانال تراغشایی TOM که TOMM40 یکی از زیرواحدهای آن است، در شناسایی و ورود پروتئین‌ها به درون میتوکندری نقش دارد. برخی عملکردهای میتوکندری از قبیل متابولیسم انرژی، آپوپتوز سلولی، سنتز لیپیدها و هموستاز سلولی وابسته به مجموعه TOM است. هماهنگ بودن مجموعه TOM برای عملکرد مناسب میتوکندری ضروری است [۷]. بر اساس مطالعات گسترده ارتباطی ژنومی، انواع پلی‌مورفیسم‌ها در ژن tomm40 با امکان ابتلا به برخی بیماری چند عاملی مانند سطوح بالای کلسترول و تریگلیسرید [۱۶, ۱۷]، بالا بودن شاخص توده بدنی [۱۸]، بیماری‌های قلبی عروقی [۱۹]، آلزایمر [۲۰] و همچنین دیابت [۲۱] ارتباط دارند. بررسی مطالعات پیشین در رابطه با نقش پلی‌مورفیسم‌های مختلف در ایجاد دیابت نوع ۲ نشان داد که بسیاری از جهش‌ها از جمله پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40 در ایجاد این بیماری نقش دارند. همچنین با توجه به ارتباط تنگاتنگ افزایش چربی خون با بروز دیابت نوع ۲ [۱۷] و نقش ثابت شده پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40 در بیماری چربی خون، در این مطالعه بر آن شدیم تا همبستگی این پلی‌مورفیسم را با خطر ابتلا به دیابت بررسی نماییم.

در سال ۲۰۲۱، Gui و همکاران گزارش نمودند که عوامل خطر بیماری‌های قلبی عروقی از جمله سیگار کشیدن، نوشیدن الکل، عدم فعالیت بدنی، چاقی، افزایش کلسترول تام، تری‌گلیسیرید، فشارخون بالا و البته دیابت؛ می‌تواند با پلی‌مورفیسم rs2075650 ارتباط داشته باشند [۲۲]. تغییرات عملکردی در میتوکندری که مرتبط با پلی مورفیسم در ناحیه rs2075650 ژن tomm40 می‌باشد ممکن است توضیحی برای ارتباط با بیماری‌های متابولیسمی از جمله دیابت ارائه دهد [۲۳]. مطالعات متاآنالیز توسط Wang و همکاران، مشخص نموده که پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40 که با اختلال عملکرد میتوکندری مرتبط است و در استرس اکسیداتیو دخیل است، به صورت بالقوه با شانس ابتلا به بیماری دیابت نوع ۲ و آلزایمر مرتبط است [۲۱]. اما در مطالعه‌ای که توسط Yamase و همکاران [۲۴] انجام شد، ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40 با امکان ابتلا به دیابت نوع ۲ مشاهده نشد که مطابق با نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر بود. بررسی پایگاه‌های مختلف نشان می‌دهد که تاکنون مطالعه‌ای جامع و دقیقی درباره نقش این پلی‌مورفیسم در ابتلا به دیابت نوع ۲ در ایران انجام نشده است و اکثر مطالعاتی که در مورد این پلی‌مورفیسم انجام شده مربوط به نقش آن در سایر بیماریها ازجمله بیماری آلزایمر است. مطالعه Hsiung و همکاران نشان داد که ارتباط معنی داری بین این پلی‌مورفیسم و شانس ابتلا به بیماری آلزایمر وجود دارد و از آنجایی‌که، ابتلا به بیماری آلزایمر در افراد دیابتی بسیار بیشتر از افراد سالم است، مطالعات گسترده‌تری بر روی نقش این پلی‌مورفیسم در ابتلا به بیماری دیابت در جمعیت‌های مختلف لازم می‌باشد [۲۵]. در مطالعه Liu و همکاران در چین بر روی پلی‌مورفیسم‌های rs8106922، rs157581 و rs2075650 ژن tomm40 مشخص شد که پلی-مورفیسم‌های rs157581 و rs2075650 ژن tomm40 با اختلال شناختی خفیف ارتباط دارند اما پلی مورفیسم rs8106922 ارتباطی با اختلال شناختی خفیف ندارد [۲۶]. در مطالعه Stepanov و همکاران در روسیه مشخص شد که پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40 با خطر ابتلا به بیماری آلزایمر در جمعیت روسی ارتباط معنی دار دارند [۲۷]. از طرفی نتایجی مشابه با مطالعه Stepanov توسط Bao و همکاران در یک متاانالیز بدست آمد [۲۸]. اختلاف مشاهده شده در نتایج پژوهش‌های مشابه با مطالعه پیش رو، ممکن

است به پلی‌مورفیسم‌های موجود در مسیرهای متابولیکی مشابه منوط باشد. همچنین سایر عوامل مداخله‌گر از جمله عوامل محیطی می‌توانند بر سطح بیان برخی هورمون‌ها از جمله انسولین تاثیر منفی داشته باشند. از سوی دیگر، اختلافات نژادی موجود در مناطق مختلف جغرافیایی بین جمعیت‌های مختلف، فاکتوری متمایز کننده است که در خطر ابتلا به انواع بیماری‌ها اثرگذار است [۲۹].

شواهد علمی نشان می‌دهد که مغز تحت تاثیر عملکرد میتوکندری قرار دارد و عملکرد صحیح میتوکندری وابسته به اکسیژن و گلوکز است. در مغز اکسیژن و گلوکز عمدتاً توسط میتوکندری پردازش می‌شوند. از آنجایی‌که بیماری آلزایمر ارتباط نزدیکی با بیماری دیابت دارد، نقص عملکرد میتوکندری می‌تواند دلیلی برای بیشتر بودن شانس ابتلا به آلزایمر در افراد دیابتی باشد. از طرف دیگر مقاومت به انسولین با افزایش خطر زوال عقل مرتبط است و پس از افزایش سن، مهمترین عامل خطر برای ایجاد بیماری آلزایمر، دیابت نوع ۲ است و نقص در مسیر سیگنالینگ IR/PI3K/Akt عامل اصلی در ایجاد هر دو بیماری است [۳۰-۳۲].

مطالعه حاضر که در جمعیتی از افراد ایرانی ساکن در شهر دلیجان استان مرکزی انجام گردید، مشخص نمود که پلی‌مورفیسم rs2075650 ژن tomm40 ارتباط معنی‌داری با خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیت مورد مطالعه ندارد، این تفاوت نتایج با مطالعات پیشین، می‌تواند مربوط به تنوع ژنتیکی بین گروه‌های نژادی باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر برای تشخیص جهش A/G در موقعیت rs2075650 ژن tomm40 روش تشخیصی سریع و مقرون به صرفه معرفی شد. البته SNP مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری با بیماری دیابت نشان نداد ($P>۰/۰۵$). اما با توجه به جمعیت محدود، بررسی‌های گسترده‌تر در منطقه مورد مطالعه و همچنین سایر جمعیت‌ها پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی: پژوهش حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد پریا احمدزاده ایراندوست می‌باشد. نویسندگان مراتب قدردانی خود را از پژوهشگاه هوافضا جهت فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی و کارکنان شبکه بهداشت و درمان شهرستان دلیجان به جهت جمع آوری نمونه‌های خون به ویژه آرزو رفیعی اعلام می‌دارند. منابع مالی توسط نویسندگان تامین شده است.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. 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 Mol Sci. 2020; 21 (17): 6275. doi:10.3390/ijms21176275 PMid:32872570 PMCid:PMC7503727
2. Padhi S, Nayak AK, Behera A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. Biomed Pharmacother. 2020;131:110708 doi:10.1016/j.biopha.2020.110708 PMid:32927252
3. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 diabetes mellitus: a review of multi-target drugs. Molecules. 2020;25(8):1987 doi:10.3390/molecules25081987 PMid:32340373 PMCid:PMC7221535
4. Aitken N, Smith S, Schwarz C, Morin PA. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. Mol Ecol. 2004; 13(6):1423-31. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02159.x PMid:15140087
5. Humphries AD, Streimann IC, Stojanovski D, Johnston AJ, Yano M, Hoogenraad NJ, et al. Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40. J Biol Chem. 2005; 280 (12):11535-43. doi:10.1074/jbc.M413816200 PMid:15644312
6. Valant V, Keenan BT, Anderson CD, Shulman JM, Devan WJ, Ayres AM, et al. TOMM40 in cerebral amyloid angiopathy related intracerebral hemorrhage: comparative genetic analysis with Alzheimer's disease. Translational stroke res. 2012;3: 102-12. doi:10.1007/s12975-012-0161-1 PMid:24323865 PMCid:PMC4054941
7. Ferencz B, Karlsson S, Kalpouzos G. Promising genetic biomarkers of preclinical Alzheimer's disease: the influence of APOE and TOMM40 on brain integrity. Int J Alzheimer's Dis. 2012;2012 doi:10.1155/2012/421452 PMid:22550605 PMCid:PMC3328927
8. 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. doi:10.1371/journal.pone.0022353 PMid:21799836 PMCid:PMC3142153
9. Peuget S, Bonacci T, Soubeyran P, Iovanna J, Dusetti N. Oxidative stress-induced p53 activity is enhanced by a redox-sensitive TP53INP1 SUMOylation. Cell Death Differentiation. 2014;21 (7):1107-18 doi:10.1038/cdd.2014.28 PMid:24608790 PMCid:PMC4207477
10. MWer S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids Res. 1988;16(3):1215 doi:10.1093/nar/16.3.1215 PMid:3344216 PMCid:PMC334765
11. 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.
12. Mesrian Tanha H, Mojtabavi Naeini M, Rahgozar S, Rasa SMM, Vallian S. Modified tetra-primer ARMS PCR as a single-nucleotide polymorphism genotyping

tool. Genet Test Mol Biomarkers. 2015; 19(3):156-61 doi:10.1089/gtmb.2014.0289 PMid:25658900
13. 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.
14. 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 doi:10.1186/s12920-015-0115-z PMid:26173390 PMCid:PMC4502642
15. 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):452-63 doi:10.1182/blood.2020010637 PMid:33728448
16. Radovica I, Fridmanis D, Silamikelis I, Nikitina-Zake L, Klovins J. Association between CETP, MLXIPL, and TOMM40 polymorphisms and serum lipid levels in a Latvian population. Meta Gene. 2014; 2: 565-78 doi:10.1016/j.mgene.2014.07.006 PMid:25606439 PMCid:PMC4287865
17. Schulze MB, Rimm EB, Shai I, Rifai N, Hu FB. Relationship between adiponectin and glycemic control, blood lipids, and inflammatory markers in men with type 2 diabetes. Diabet Care. 2004;27 (7):1680-7 doi:10.2337/diacare.27.7.1680 PMid:15220246
18. Kulminski AM, Loika Y, Culminskaya I, Huang J, Arbeev KG, Bagley O, et al. Independent associations of TOMM40 and APOE variants with body mass index. Aging Cell. 2019;18(1):e12869 doi:10.1111/acel.12869 PMid:30462377 PMCid:PMC6351823
19. Middelberg RP, Ferreira MA, Henders AK, Heath AC, Madden PA, Montgomery GW, et al. Genetic variants in LPL, OASL and TOMM40/APOE-C1-C2-C4 genes are associated with multiple cardiovascular-related traits. BMC Med Genetics. 2011;12:1-9 doi:10.1186/1471-2350-12-123 PMid:21943158 PMCid:PMC3189113
20. Soyal SM, Kwik M, Kalev O, Lenz S, Zara G, Strasser P, et al. A TOMM40/APOE allele encoding APOE-E3 predicts high likelihood of late-onset Alzheimer's disease in autopsy cases. Mol Genetics Genomic Med. 2020;8(8):e1317 doi:10.1002/mgg3.1317 PMid:32472747 PMCid:PMC7434743
21. 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 Neurol Sci. 2017; 380: 262-72. doi:10.1016/j.jns.2017.07.044 PMid:28870582 PMCid:PMC6693589
22. Gui W, Qiu C, Shao Q, Li J. Associations of vascular risk factors, APOE and TOMM40 polymorphisms with cognitive function in dementia-free Chinese older adults: a community-based study. Front Psychiatry. 2021; 12: 617773 doi:10.3389/fpsyt.2021.617773 PMid:33790814 PMCid:PMC8005534
23. Chen S, Sarasua SM, Davis NJ, DeLuca JM, Boccuto L, Thielke SM, et al. TOMM40 genetic variants associated with healthy aging and longevity: a systematic review. BMC Geriatrics. 2022;22(1): 667 doi:10.1186/s12877-022-03337-4 PMid:35964003 PMCid:PMC9375314
24. Yamase Y, Horibe H, Ueyama C, Fujimaki T, Oguri M, Kato K, et al. Association of TOMM40 and SLC22A4 polymorphisms with ischemic stroke. Biomed Rep. 2015;3(4):491-8 doi:10.3892/br.2015.457 PMid:26171154 PMCid:PMC4487021
25. Omoumi A, Fok A, Greenwood T, Sadovnick AD, Feldman HH, Hsiung G-YR. Evaluation of late-onset Alzheimer disease genetic susceptibility risks in a Canadian population. Neurobiol Aging. 2014;35(4): 936. e5e12. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.025 PMid:24176626
26. Liu X, Yue C, Xu Z, Shu H, Pu M, Yu H, et al. Association study of candidate gene polymorphisms with amnestic mild cognitive impairment in a Chinese population. PLoS One. 2012;7(7):e41198. doi:10.1371/journal.pone.0041198 PMid:22911757 PMCid:PMC3401144
27. Bocharova A, Vagaitseva K, Marusin A, Zhukova N, Zhukova I, Minaycheva L, et al. Association and Gene-Gene Interactions Study of Late-Onset Alzheimer's Disease in the Russian Population. Genes. 2021;12 (10):1647 doi:10.3390/genes12101647 PMid:34681041 PMCid:PMC8535278
28. Bao J, Wang X-j, Mao Z-f. Associations between genetic variants in 19p13 and 19q13 regions and susceptibility to Alzheimer disease: A meta-analysis. Med Sci Monitor: Int Med J Exp Clin Res. 2016; 22:234 doi:10.12659/MSM.895622 PMid:26795201 PMCid:PMC4727495
29. Burchard EG, Ziv E, Coyle N, Gomez SL, Tang H, Karter AJ, et al. The importance of race and ethnic background in biomedical research and clinical practice. N Engl J Med. 2003;348(12):1170-5. doi:10.1056/NEJMsb025007 PMid:12646676
30. Bendlin BB. Antidiabetic therapies and Alzheimer disease. Dialogues in clinical neuroscience. 2022.
31. Roses A, Sundseth S, Saunders A, Gottschalk W, Burns D, Lutz M. Understanding the genetics of APOE and TOMM40 and role of mitochondrial structure and function in clinical pharmacology of Alzheimer's disease. Alzheimer's Dementia. 2016;12 (6):687-94 doi:10.1016/j.jalz.2016.03.015 PMid:27154058
32. Su M, Naderi K, Samson N, Youssef I, Fülöp L, Bozso Z, et al. Mechanisms associated with type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer-related pathology. Mol Neurobiol 2019;56:5815-34 doi:10.1007/s12035-019-1475-8 PMid:30684218

How to Cite this Article:
Salavatifar M, Ahmadzadeh Irandoust P, Jamshidain F. Association of rs2075650 polymorphism of tomm40 gene with type 2 diabetes in Dilijan city, Iran. Feyz Med Sci J. 2023;27(5):539-547.
doi: 10.48307/FMSJ.2023.0.5.541