

بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های Ala512Pro و Gly972Arg در ژن IRS1 با بیماری دیابت نوع ۲ در استان سیستان و بلوچستان

علی اسلامی^۱، احمد راشکی^{۲*}، سید کاظم صباغ^۳، زهرا راشکی قلعه‌نو^۴

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران ۲- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، مجتمع علوم دانشگاه یزد، یزد، ایران ۴- استادیار، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

اطلاعات	خلاصه فارسی
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: دیابت نوع ۲ شایع‌ترین نوع دیابت بوده و ۹۰٪ موارد این بیماری را به خود اختصاص داده است. ژن انسولین رسپتور سوبسترای ۱- (IRS1) به‌عنوان میانجی بین گیرنده‌های انسولین و شبکه پیچیده‌ای از مولکول‌های پیام‌رسان داخل سلول‌های ماهیچه‌ای، کبد و بافت چربی ایفای نقش می‌کند. لذا ممکن است کاندید مناسبی برای استعداد ابتلاء به دیابت نوع ۲ باشد. در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم‌های Ala512Pro و Gly972Arg ژن IRS1 با استعداد ابتلاء به دیابت نوع ۲، مورد ارزیابی قرار گرفت.
تاریخچه مقاله: وصول: ۹۷/۷/۲۰ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۲	روش کار: در این پژوهش مورد- شاهدهی ۱۰۰ بیمار مبتلاء به دیابت نوع ۲ و ۱۰۰ فرد سالم بررسی شدند. استخراج DNA با استفاده از روش ترکیب فنل- کلروفرم با پروتیناز K انجام شد. تعیین ژنوتیپ افراد به روش RFLP-PCR انجام شد. سپس آنالیز آماری نتایج با استفاده از آزمون کای-دو صورت گرفت.
کلیدواژگان: بیماری دیابت نوع ۲ پلی مورفیسم ژن IRS1	نتایج: نتایج به‌دست آمده، نشان داد درصد فراوانی ژنوتیپ‌های GA، GG و AA برای پلی مورفیسم rs1801278 (Gly972Arg) در افراد بیمار ۸۲/۱۸ و ۰ درصد و در افراد سالم ۱۵/۸۵ و ۰ درصد بود. نتایج بررسی آماری نشان داد که فراوانی آللی و ژنوتیپی Gly972Arg در گروه بیمار و کنترل اختلاف معناداری نداشت (P=۰/۶۱). همچنین پلی مورفیسم Ala512Pro در جمعیت سیستان و بلوچستان یافت نشد.
نویسنده مسئول: احمد راشکی موبایل: ۰۹۱۵۱۹۷۰۸۷۷ ایمیل: ah_rashki@usal.es	نتیجه‌گیری: تحلیل آماری نتایج به‌دست آمده، نشان‌دهنده عدم ارتباط آلل‌های این دو پلی مورفیسم از ژن IRS1 در جمعیت سیستان و بلوچستان با خطر بروز بیماری دیابت نوع ۲ بود.

لطفاً به مقاله به شکل زیر استناد کنید:

اسلامی ع، راشکی ا، صباغ س. ک، راشکی قلعه‌نو ز. بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های Ala512Pro و Gly972Arg در ژن IRS1 با بیماری دیابت نوع ۲ در استان سیستان و بلوچستان. مجله دانشگاه علوم پزشکی جیرفت، پاییز و زمستان ۱۳۹۷؛ ۵(۲): ۵۶-۶۶.

مقدمه

بیماری دیابت، یک بیماری مزمن ناتوان کننده و تهدید جدی برای سلامتی افراد محسوب می‌شود که ۶٪ از مرگ‌ومیرهای در سطح جهان را باعث می‌شود. در عصر حاضر و با صنعتی شدن کشورها بیماری دیابت به شکل همه گیر و بی سابقه‌ای در سراسر جهان در حال افزایش است که نشان دهنده‌ی تأثیر بالای شیوه زندگی بر این بیماری است (۱). در حال حاضر بیش از ۱۷۰ میلیون نفر در سراسر جهان به دیابت نوع ۲ مبتلا می‌باشند و احتمال می‌رود که تا سال ۲۰۳۰ شمار مبتلایان به مرز ۳۶۶ میلیون نفر برسد (۲، ۳). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد تعداد فراد مبتلا در ایران ۳ تا ۴ میلیون برآورد شده است. شیوع این بیماری در کل جمعیت ایران ۲ تا ۳ درصد و در افراد بالای ۳۰ سال ۷/۳٪ می‌باشد (۴). شناسایی عوامل پدیدآورنده بیماری دیابت نوع ۲ دشوار است زیرا عوامل محیطی و ژنتیکی متعدد و تأثیر متقابل بین آنها در بروز بیماری؛ مؤثر می‌باشد. مطالعات همبستگی نشان دادند که برخی از ژن‌ها با بیماری دیابت نوع ۲ ارتباط دارند ولی با توجه به جمعیت مورد مطالعه، نوع ژن‌های درگیر در بیماری، می‌تواند متفاوت باشد. یکی از ژن‌های کاندید که در طی این سال‌ها ارتباط آن با بیماری دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار گرفته است ژن *IRS1* می‌باشد (۳). این ژن در بافت‌های هدف انسولین، مثل ماهیچه‌های اسکلتی، کبد، بافت چربی و پانکراس بیان می‌شود. پروتئین *Irs1* به‌عنوان یک مولکول آغازین و لنگرگاهی بین گیرنده انسولین و پروتئین‌های پایین دستی، نقش واسطه‌نگر را بازی می‌کند. بنابراین تغییر ساختار ژن و به دنبال آن

پروتئین *Irs1* می‌تواند نقص‌های وسیعی در مسیر پیام‌رسان انسولین ایجاد کند (۵-۷). این نقص‌ها در پانکراس و بافت هدف انسولین می‌تواند به ترتیب، باعث کاهش ترشح و مقاومت به انسولین شود. از جمله تغییراتی که می‌تواند با بیماری دیابت نوع ۲ ارتباط داشته باشد، پلی مورفیسم‌های Ala512Pro و Gly972Arg است که باعث جایگزینی پرولین (Pro) به جای آلانین (Ala) و اسید آمینه آرژنین (Arg) به جای گلیسین (Gly) در کدون‌های ۵۱۲ و ۹۷۲ پروتئین *Irs1* می‌شود (۸). با توجه به موقعیت پلی مورفیسم‌ها، محصول پروتئینی می‌تواند از لحاظ عملکرد دچار تغییر شود. چندین مطالعه گسترده ژنومی نشان دادند که پلی مورفیسم‌های این ژن با بیماری دیابت نوع ۲ ارتباط دارد (۵، ۹).

متعاقباً مطالعات دیگری بر روی جمعیت‌های هند و سرخ‌پوستان آمریکا انجام شد که در آن یکی از پلی مورفیسم‌های این ژن (*Gly972Arg*) با بیماری دیابت نوع ۲ ارتباط داشت (۱۰، ۱۱) اما در جمعیت‌های کشور فنلاند و آمریکایی‌های مکزیک‌تبار، این ارتباط مشاهده نشد (۱۲، ۱۳). تفاوت‌های نژادی بین جمعیت‌های مختلف که بیش‌تر زمینه ژنتیکی دارند؛ از جمله دلایل مستعد بودن افراد به دیابت نوع ۲ می‌باشد. در جمعیت‌های آسیایی نیز نتایج متناقضی از ارتباط پلی مورفیسم‌های این ژن با دیابت نوع ۲ به دست آمده است که برای بررسی این موضوع، این مطالعه در جمعیت ایران انجام گرفت.

هدف مطالعه حاضر بررسی ارتباط پلی مورفیسم Ala512Pro و Gly972Arg در ژن *IRS1* در جمعیت استان سیستان و بلوچستان است.

¹ Insulin Receptor

روش کار

جمعیت مورد مطالعه

این مطالعه بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان کنترل انجام شد. افراد دیابتی از مراجعه‌کنندگان به کلینیک دیابت بیمارستان علی اصغر (ع) زاهدان و بیمارستان امیرالمومنین (ع) زابل و گروه کنترل از افراد سالم که معیارهای ابتلاء به دیابت و سابقه فامیلی این بیماری را در اقوام درجه اول و دوم نداشتند، به صورت تصادفی انتخاب شدند. ابتلاء به دیابت با معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۲ به صورت قند خون ناشتا (FBS)^۳ بالاتر از 126mg/dL یا قند دو ساعته پس از مصرف گلوکز (DGTT)^۴ بیش‌تر از 200 mg/dL و با مصرف داروی ضد دیابت به تشخیص پزشک تعریف شد. نمونه‌گیری پس از ارایه آگاهی لازم و کسب رضایت‌نامه کتبی از افراد، انجام گرفت.

نمونه‌گیری خون و تعیین ژنوتیپ

از هر یک از افراد مورد مطالعه به میزان ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد. سپس DNA با استفاده از روش ترکیب فنل-کلروفرم با پروتیناز K مطابق پروتکل زیر، استخراج شد. ابتدا ۴۰۰ میکرولیتر از خون افراد با یک میلی‌لیتر بافر سرد تجزیه گلبول قرمز (ساکاروز ۳۲٪ مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار (pH, 7.5)، MgCl₂ ۵ میلی‌مولار و ۱٪ Triton-X100) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰°C قرار داده شد. نمونه‌های مخلوط شده با بافر لیزکننده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰°C با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از خاتمه سانتریفوژ محلول رویی دور

²World Health Organization (WHO)

³Fasting Blood Sugar (FBS)

⁴Diabet Glucose Tolerance Test (DGTT)

ریخته شد و به لخته باقی‌مانده مجدداً ۱ میلی‌لیتر بافر سرد تجزیه گلبول اضافه و با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر بافر تجزیه گلبول سفید (NaCl/EDTA) به همراه ۳۰ میکرولیتر SDS ۱۰٪ و ۲۵ میکرولیتر پروتیناز K اضافه و به مدت یک شب در دمای ۳۷°C گرماگذاری گردید (SDS^۵ به حل شدن لیپدها و پروتییناز K به شکستن پروتئین‌ها و هیستون‌ها کمک می‌کند). سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر فنل اشباع شده به هر لوله اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴۰°C سانتریفوژ شد. در این مرحله محلول رویی به تیوب جدید منتقل و به همان میزان کلرفرم/ ایزوآمیل الکل اضافه و به آرامی مخلوط و مجدداً با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس فاز دوم که حاوی DNA است، به تیوب جدید منتقل و به نسبت یک‌ونیم برابر حجم آن، ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰°C- قرار داده شد.

تیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی تخلیه و رسوب حاصله با ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ سرد، شستشو داده شد. پس از خشک شدن الکل، DNA رسوب داده شده با ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل و تا انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

انجام RFLP-PCR

قسمتی از ژن *IRS1* که حاوی پلی مورفیسم Ala512Pro و Gly972Arg بود با تکنیک PCR و پرایمرهای جدول ۱ تکثیر گردید. از روش RFLP-PCR برای تعیین تفاوت آلی و ژنوتیپی بین دو گروه بیمار و شاهد استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه

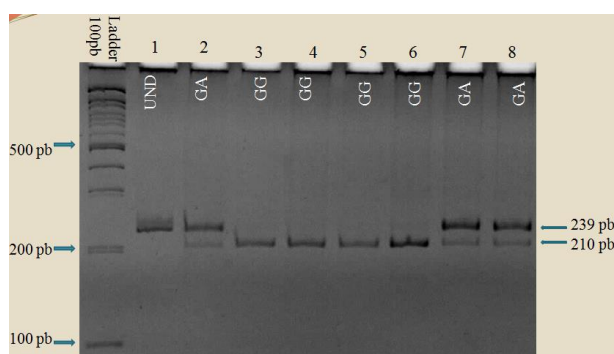
⁵ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

سیکل شامل: واسرشتگی ثانویه در 95°C به مدت 50 ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای 61°C به مدت 40 ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای 72°C به مدت 50 ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای 72°C به مدت 7 دقیقه بود. پس از انجام واکنش، 5 میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز 2% به مدت 40 دقیقه تحت تأثیر ولتاژ 75 الکتروفورز شد. قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر 100 جفت باز، ارزیابی شد (شکل ۱).

ترموسایکلر ایندورف انجام گردید. برای انجام فرآیند PCR آنزیم Master Mix RED $2\times$ از شرکت پیشگام خریداری گردید. در این واکنش، 2 میکرولیتر از DNA الگو $12/5$ میکرولیتر از آنزیم Master Mix RED $2\times$ و یک میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse (20 میکومول در میکرولیتر) با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی آن با آب مقطر دو بار تقطیر به 25 میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی اولیه در 95°C به مدت 5 دقیقه و سپس 35

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

اندازه پرایمر (جفت باز)	توالی پرایمر (5' → 3')	نام پرایمر
۲۳۹	TTT GGG AGT GAT AGT CTG GCT AC	Gly972-F
	CGG GTA GGC CTG CAA ATG CTA	Gly972-R
۴۵۳	CTC TTC CCA CGG CGA TCT AGT	Ala512-F
	GGC AGG CAT CAT CTC TGT GT	Ala512-R



شکل ۱- بررسی پلی مورفیسم Gly972Arg به روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *SmaI* و ژل پلی آکریل آمید 12 نمونه‌های ۳، ۴، ۵، ۶ دارای ژنوتیپ GG و فاقد پلی مورفیسم مورد نظر و نمونه‌های ۲، ۷، ۸ دارای ژنوتیپ GA و دارای پلی مورفیسم می‌باشند

نتایج

هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR

توسط آنزیم *SmaI* برای Gly972Arg طبق دستورالعمل پیوست شرکت در دمای 30°C به مدت 16 ساعت هضم شد. برای پلی مورفیسم Ala512Pro نیز 5 میکرولیتر از محصول PCR با آنزیم *Dra III* (Fast Digest) در دمای 37°C به مدت 15 دقیقه هضم گردید. سپس محصول PCR هضم شده از نمونه‌های بیمار و شاهد در ژل پلی آکریلامید 15% بارگذاری شد (شکل ۱).

ابتدا از سایت NEB Cutter و Web Cutter آنزیم‌های محدودکننده مناسب *SmaI* برای توالی پلی مورفیسم Gly972Arg و آنزیم *Dra III* برای پلی مورفیسم Ala512Pro انتخاب شد. آنزیم‌ها از شرکت Fermentase با واسطه شرکت پیشگام تهیه شد. برای انجام هضم آنزیمی ابتدا 5 میکروگرم از محصول PCR

تجزیه و تحلیل آماری

فراوانی آل‌ها با شمارش محاسبه نسبت آنها، تعیین شد. با آزمون کای ۲، قرارگیری جامعه در تعادل هاردی-واینبرگ تأیید شد. توزیع ژنوتیپ و آل‌های مختلف در دو گروه بیمار و شاهد مقایسه شد. در این مطالعه پس از جمع‌آوری ۱۰۰ نمونه از خون محیطی افراد بیمار دیابتی و ۱۰۰ نمونه از افراد غیردیابتی به‌عنوان گروه کنترل پیوستگی دو پلی مورفیسم با بیماری، مورد بررسی ژنوتیپی قرار گرفتند. نمونه‌های گروه کنترل از نظر جنسیت، سن و نژاد با گروه بیمار مطابقت داشتند. تعداد بیماران مرد و زن به ترتیب ۴۰ و ۶۰ نفر و گروه کنترل شامل ۴۵ نفر مرد و ۵۵ نفر زن بودند. هیچ‌کدام از افراد گروه کنترل، سابقه قندخون بالا نداشته و افراد انتخاب شده در این دو گروه دارای میانگین و رده سنی یکسان بودند.

ابتدا دو قطعه از ژن *IRS1* که حاوی محل‌های برش آنزیمی *DraIII* (CACNNN GTG) برای پلی مورفیسم Ala512Pro و آنزیم *SmaI* (CCC GGG) برای پلی مورفیسم Gly972Arg با پرایمرهای جدول ۱ به روش PCR تکثیر شد. بعد از هضم با آنزیم *SmaI*، قطعه ۲۳۹ جفت باز دارای دو مکان اثر به ترتیب ۲۱۰ و ۲۹ جفت باز بود. در صورت وجود پلی مورفیسم Gly972Arg جایگزینی نوکلئوتید A به جای G ژنوتیپ‌های نوع وحشی GG با قطعات ۲۱۰ و ۲۹ جفت باز و ژنوتیپ دارای پلی مورفیسم GA با قطعات ۲۳۹، ۲۱۰ و ۲۹ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱). برای پلی مورفیسم Ala512Pro تنها ژنوتیپ مشاهده شده، نوع وحشی GG بود. همراهی و ارتباط پلی مورفیسم Gly972Arg با بیماری دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- فراوانی (درصد) ژنوتیپی، آلی و نتایج بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در دو جمعیت بیمار و کنترل برای پلی مورفیسم Gly972Arg.

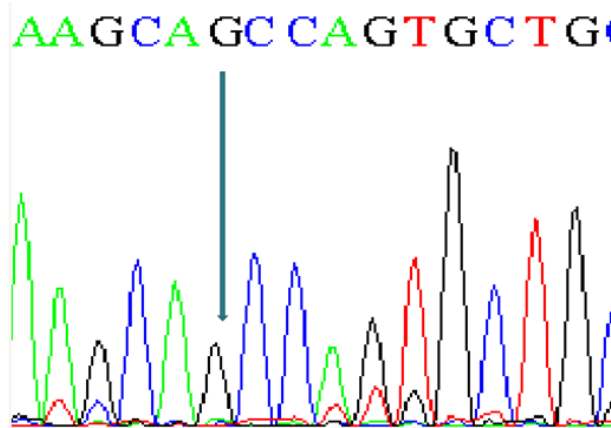
Gly972Arg SNP							
Allele Frequency %		H-W equilibrium		H-W equilibrium			Number Subject
A	G	p	df	AA	GA	GG	
۹	۹۱	۰/۶۱	۲	۰	۱۸	۸۲	بیمار: ۱۰۰
۷/۵	۹۲/۵	۰/۷۲	۲	۰	۱۵	۸۵	کنترل: ۱۰۰

ارزش P-valueها بالاتر از ۰/۰۵ است و این نشان‌دهنده این است که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارد

افراد بیمار ۱۸ نفر هتروزایگوت GA و ۸۲ نفر هموزایگوت GG بودند. انجام آزمایش کای ۲ مستقل در فاصله اطمینان ۹۵٪ نشان داد که ژنوتیپ هتروزایگوت برای ژن *IRS1* (Gly972Arg) ارتباط معناداری با ابتلاء به بیماری نوع ۲ ندارد ($P=۰/۶۱$). نتایج هم‌ترازی^۶ نمونه‌های تعیین توالی شده با توالی اصلی و تطابق نتایج هضم آنزیمی با ژنوتیپ نمونه‌های تعیین توالی شده، صحت توالی تکثیری و ژنوتیپ قطعات هضم آنزیمی شده را نشان داد (اشکال ۲ و ۳).

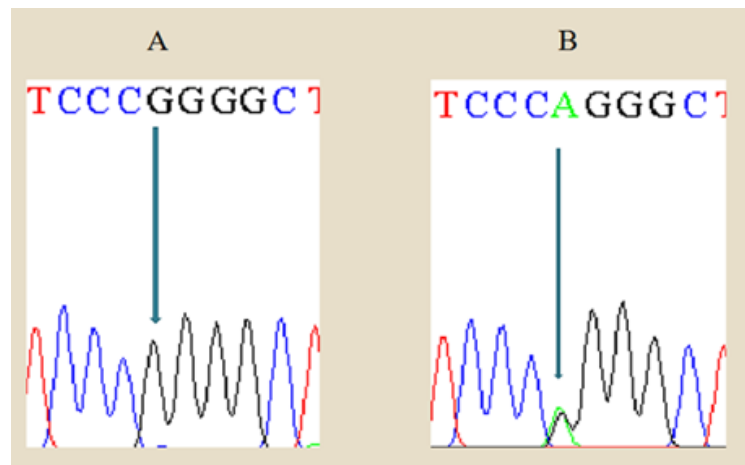
فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف این ژن در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشت. توزیع آلی و ژنوتیپی پلی مورفیسم Gly972Arg در دو گروه بیمار و کنترل در جدول ۲ بیان شده است. فراوانی آل G به ترتیب ۹۱٪ و ۹۲/۵٪ و فراوانی آل A به ترتیب ۹٪ و ۷/۵٪ در دو گروه بیمار و کنترل بود. هیچ ارتباطی بین فراوانی ژنوتیپ‌ها و آل‌های G و A با بیماری دیابت نوع ۲ در جمعیت مورد مطالعه، دیده نشد. در توزیع ژنوتیپی برای افراد سالم، ۱۵ نفر هتروزایگوت GA و ۸۵ نفر هموزایگوت GG و برای

⁶ Alignment



شکل ۲- تنها آلل و واریانت شناسایی شده از ژن *IRS1* در جایگاه پلی مورفیسم Ala512Pro در نمونه‌های مورد مطالعه. حالت هموزیگوت

G/G



شکل ۳- واریانت‌های شناسایی شده از ژن *IRS1* در جایگاه پلی مورفیسم Gly972Arg در نمونه‌های مورد مطالعه

حالت (A): هموزیگوت G/G. (B): هتروزیگوت G/A. مطابق با نتایج هضم آنزیمی

بحث

همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای بر روی جمعیت مکزیکی، اختلاف معنادار آلل A را در بیماران با دیابت نوع ۲ نشان دادند (۱۴). کومار^۸ و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ نقش آلل A را در بروز دیابت نوع ۲ در جمعیت هند، مؤثر دانستند (۱۵). المایند^۹ و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که مجموع حاملان آلل A و C در جمعیت بیمار جمعیت دانمارک، اختلاف معناداری دارد و فراوانی مجموع این دو آلل در گروه بیمار و کنترل، به ترتیب ۱۹ و ۷ درصد

با وجود مطالعات ژنتیکی وسیع انجام شده، نتایج روشنی در مورد ژن‌ها و پلی مورفیسم‌های مرتبط با بیماری دیابت نوع ۲ به دست نیامده است. همانند بسیاری از ژن‌های کاندید، مطالعات ژنتیکی بسیاری بر روی ژن *IRS1* صورت گرفته و ارتباط آلل‌های خطر A و C به ترتیب از دو پلی مورفیسم Ala512Pro و Gly972Arg با بیماری دیابت نوع ۲ اثبات شده است. گارسیا بورگت^۷ و

⁸ Kumar

⁹ Almind

⁷ Garcia Burguet

گزارش شد (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای بر روی جمعیت ترکیه به‌وسیله ارکانگلو سور^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۰۵، مشاهده کردند که دو آلل A و C ارتباط معناداری با بیماری دیابت نوع ۲ نداشت (۱۷). در این مطالعه نیز ارتباط معناداری بین آلل‌های A و C از ژن IRS1 با بیماری دیابت نوع ۲ در جمعیت سیستان و بلوچستان مشاهده نشد و فراوانی آلل خطر A در دو گروه ۱۰۰ نفری بیمار و کنترل به ترتیب، ۹ و ۷/۵ درصد و فراوانی ژنوتیپ GA ۱۸ و ۱۵ درصد مشاهده شد. ژنوتیپ خطر AA در هیچ‌کدام از گروه‌های مورد مطالعه، یافت نشد. در بررسی ارتباط پلی مورفیسم Ala512Pro با بیماری دیابت نوع ۲ در این جمعیت، هیچ آلل خطر C در دو گروه بیمار و کنترل یافت نشد و آلل GG تنها ژنوتیپ موجود در جمعیت مورد مطالعه بود. همانند بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی ارتباط پلی مورفیسم با بیماری، نتایج متفاوتی به‌دست آمد (۱۸-۲۰) که با یافته‌های این مطالعه از جنبه‌های مختلف، قابل بحث است. با توجه به چندعاملی و هتروژنی بودن بیماری دیابت نوع ۲، نتایج متفاوت به‌دست آمده برای ژن IRS1 را می‌توان به تفاوت در فراوانی پلی مورفیسم‌های این ژن در جمعیت‌های مختلف و تفاوت‌های ژنتیکی و محیطی نسبت داد. بررسی حاضر، فراوانی ژنوتیپ GA را در دو گروه بیمار و کنترل به‌ترتیب ۱۸ و ۱۵ درصد نشان داد که در مقایسه با میانگین جهانی این پلی مورفیسم (گروه بیمار و کنترل به‌ترتیب ۱۲ و ۶ درصد) با فراوانی تقریباً دو برابری همراه بود. این یافته‌ها اثر متقابل بین ژن IRS1 و دیگر عوامل ژنتیکی و محیطی را نشان می‌دهد که به بروز دیابت نوع ۲ کمک می‌کند (۲۱). برای آگاهی از اثرات تقابلی بر ژن IRS1 انسانی، نیاز به شناخت ساختار هاپلوتایپی نواحی ژن IRS1 و تعیین سیستماتیک واریانت‌های شایع این ژن در نمونه‌های بزرگی از بیماران دیابتی است. با توجه به همی موارد ذکر شده و کاهش ۳۰ درصدی جذب گلوکز در افراد کنترل با آلل A در

مقایسه با افراد فاقد این آلل (۲۲)، می‌توان نتیجه گرفت که عدم ارتباط این آلل با بیماری دیابت نوع ۲ در بررسی حاضر، ممکن است در اثر عدم وجود عامل ژنتیکی تأثیرگذار باشد. در حالی که امکان فراهم آمدن عوامل مکمل محیطی و ژنتیکی برای تقویت اثر جزئی این پلی مورفیسم وجود دارد. از طرفی عدم مشاهده شکل هموزیگوت (AA) پلی مورفیسم Gly972Arg در این مطالعه، می‌تواند دلیل دیگری بر عدم این ارتباط باشد. بنابراین نتایج آلل A و عدم مشاهده آلل C در این مطالعه، نشان می‌دهد که زمینه ژنتیکی و محیطی برای ابتلاء شدن به بیماری‌های هتروژنی همچون دیابت نوع ۲، در نژادها و جمعیت‌های مختلف متفاوت است که می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که این دو پلی مورفیسم همانند سایر یافته‌های گزارش شده، لزوماً یک پلی مورفیسم ضروری و تأثیرگذار برای بروز بیماری دیابت نوع ۲ در همه جمعیت‌ها محسوب نمی‌شود. همچنان که آلل خطر در جمعیت سرخ‌پوستان آمریکا که بیش از ۵۰٪ از جمعیت آنها به دیابت مبتلا می‌باشند، یافت نشده است (۶). مشاهده اشکال هموزیگوت و هتروزیگوت آلل خطر A در افراد غیردیابتی، این نظریه را که یک مسیر فرعی ممکن است نقص در این ژن را جبران کند، تقویت می‌کند (۲۳). از این جهت با توجه به مطالعات پیوستگی ژن‌ها، حتی این احتمال وجود دارد که ارتباط معنادار پلی مورفیسم Gly972Arg با بیماری دیابت نوع ۲ در بعضی از مطالعات گذشته، بیش از آن که نتیجه خود این پلی مورفیسم باشد، نتیجه واریانت‌های ژنتیکی و اثرگذار نزدیک به آن بوده است. علاوه بر موارد گفته شده در این‌گونه مطالعات، تعداد و نحوه انتخاب افراد مورد مطالعه نیز بر یافته‌ها مؤثرند. انجام این‌گونه مطالعات در سطح وسیعی از نمونه‌ها که شرایط سنی موردنظر را دارا هستند، نتایج مطمئن‌تری به همراه داشته و به ارزش مطالعه می‌افزاید. یناکوریس^{۱۱} و همکاران در سال ۲۰۱۲ در انگلستان نشان دادند که

¹¹ Yiannakouris

¹⁰ Orkunoglu Suer

نتیجه گیری

با توجه به دقت روش RFLP-PCR و آزمایشات تکمیلی انجام شده در این مطالعه از جمله تعیین توالی محصول PCR، پیشنهاد می‌شود نتایج حاصل؛ شامل فراوانی بالاتر از سطح جهانی پلی مورفیسم Gly972Arg و عدم وجود پلی مورفیسم Ala512Pro در نمونه‌های مورد مطالعه، دلیل بر توزیع متفاوت پلی مورفیسم‌ها در جمعیت‌های مختلف جهانی است.

تعارض منافع

سهم تمامی نویسندگان در این مطالعه یکسان است و هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه زابل با کد اخلاق IR-UOZ-92.11 می‌باشد. در ضمن از بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالمی که در این مطالعه همکاری داشتند و همچنین از پرسنل مرکز دیابت بیمارستان علی‌اصغر (ع) زاهدان و بیمارستان امیرالمومنین (ع) زابل که زحمت نمونه‌گیری را بر عهده داشتند، قدردانی می‌شود.

References

1. Stevens PR, Macfadyen WA. Familial incidence of juvenile diabetis mellitus, progressive optic atrophy, and neurogenic deafness. The British journal of ophthalmology. 1972 Jun;56(6):496.
2. Ioannidis A, Ikononi E, Dimou NL, Douma L, Bagos PG. Polymorphisms of the insulin receptor and the insulin receptor substrates genes in polycystic ovary syndrome: a Mendelian randomization meta-analysis. Molecular genetics and metabolism. 2010 Feb 28;99(2):174-83.

پلی مورفیسم‌های ژن *IRS1* در سنین بالا، خطر اختلال در تحمل گلوکز را بالا می‌برند (۲۴). بنابراین در این گونه مطالعات با انتخاب نمونه‌هایی با رده سنی بالا، ممکن است نتایج مطمئن‌تری به دست آید. همچنین در مطالعات انجام شده به صورت متاآنالیز بر روی تعداد زیادی از افراد در بیش‌تر موارد، ارتباط پلی مورفیسم‌های این ژن با دیابت نوع ۲ زمانی از لحاظ آماری معنادار بوده است (۲۵) که بتواند احتمال ارتباط پلی مورفیسم‌ها به‌ویژه پلی مورفیسم‌های غیرشایع را با بیماری‌هایی همچون دیابت نوع ۲ بالا برد. با توجه به این که در این بررسی، پلی مورفیسم Ala512Pro در هیچ‌کدام از افراد مورد مطالعه یافت نشد، می‌توان گفت که این پلی مورفیسم کمیاب و یا احتمالاً غایب، هیچ نقشی در بروز دیابت نوع ۲ در این جمعیت ندارد و توزیع و تأثیرگذاری بسیار متفاوت این پلی مورفیسم در جوامع مختلف مشاهده شد. پلی مورفیسم Ala512Pro در جمعیت فنلاند، ترکیه، هند و بعضی دیگر از جمعیت‌ها هم؛ غایب یا کمیاب بوده است (۷، ۱۶، ۱۷، ۲۶). مقایسه فراوانی پلی مورفیسم Gly972Arg در جمعیت سیستان و بلوچستان با سایر جمعیت‌های مورد مطالعه، نشان داد که فراوانی این پلی مورفیسم مشابه با جمعیت ایتالیا و نسبت به جمعیت ژاپن، هند، دانمارک، مکزیکی‌های آمریکایی تبار و دیگر جمعیت‌های مورد مطالعه فراوانی بیش‌تری را داشته است (۶).

3. Johansen A, Jensen DP, Bergholdt R, Mortensen HB, Pociot F, Nerup J, et al Danish Society of Childhood Diabetes. IRS1, KCNJ11, PPAR γ 2 and HNF-1 α : do amino acid polymorphisms in these candidate genes support a shared aetiology between type 1 and type 2 diabetes? Diabetes, Obesity and Metabolism. 2006 Jan;8(1):75-82.
4. Ahmadi A, Hasanzadeh J, Ghaem H, Khosravi S, Reisi R. The survey of family history of diabetes in patients with type 2 diabetes in Chaharmahal va Bakhteyari province, Iran, 2008. Journal of Shahrekord

- University of Medical Sciences. 2009; 11(2):1-7.
5. Federici M, Hribal ML, Ranalli M, Marselli L, Porzio O, Lauro D, et al. The common Arg972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets. The FASEB Journal. 2001 Jan;15(1):22-4.
 6. Bezerra RM, Chadid TT, Altemani CM, Sales TS, Menezes R, Soares MC, et al. Lack of Arg972 polymorphism in the IRS1 gene in Parakana Brazilian Indians. Human biology. 2004;76(1):147-51.
 7. Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Shoji S, Kohno S, Koyama KI, et al. Codon 972 polymorphism of the insulin receptor substrate-1 gene in impaired glucose tolerance and late-onset NIDDM. Diabetes Care. 1998 May 1;21(5):753-6.
 8. Hribal ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accili D, et al. The Gly→Arg972 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000 May 1;85(5):2004-13.
 9. Marini MA, Frontoni S, Mineo D, Bracaglia D, Cardellini M, De Nicolais P, et al. The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an atherogenic profile in offspring of type 2 diabetic patients. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2003 Jul 1;88(7):3368-71.
 10. Kumar R, Sharan N. Analysis of codon 972 (Gly→Arg) polymorphism in *IRS-1* gene in type 2 diabetic population. Journal of Medical Biochemistry. 2012 Jul 1;31(3):234-8.
 11. Kovacs P, Hanson RL, Lee YH, Yang X, Kobes S, Permana PA, et al. The role of insulin receptor substrate-1 gene (*IRS1*) in type 2 diabetes in Pima Indians. Diabetes. 2003 Dec 1;52(12):3005-9.
 12. Celi FS, Negri C, Tanner K, Raben N, De Pablo F, Rovira A, et al. Molecular scanning for mutations in the insulin receptor substrate-1 (*IRS-1*) gene in Mexican Americans with Type 2 diabetes mellitus. Diabetes/metabolism research and reviews. 2000 Sep;16(5):370-7.
 13. Laakso M, Malkki M, Kekäläinen P, Kuusisto J, Deeb SS. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes. The Journal of clinical investigation. 1994 Sep 1;94(3):1141-6.
 14. Burguete-Garcia AI, Cruz-Lopez M, Madrid-Marina V, Lopez-Ridaura R, Hernández-Ávila M, Cortina B, et al. Association of Gly972Arg polymorphism of IRS1 gene with type 2 diabetes mellitus in lean participants of a national health survey in Mexico: a candidate gene study. Metabolism. 2010 Jan 1;59(1):38-45.
 15. Kumar N, Sharma G, Kaur G, Tandon N, Bhatnagar S, Mehra N. Major histocompatibility complex class I chain related gene-A microsatellite polymorphism shows secondary association with type 1 diabetes and celiac disease in North Indians. Tissue antigens. 2012 Oct;80(4):356-62.
 16. Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald S, Pedersen O. Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Lancet. 1993 Oct 2;342(8875):828-32.
 17. Suer FE, Mergen H, Bolu E, Ozata M. Molecular scanning for mutations in the insulin receptor substrate-1 (*IRS-1*) gene in Turkish with type 2 diabetes mellitus. Endocrine journal. 2005;52(5):593-8.
 18. Alharbi KK, Khan IA, Abotalib Z, Al-Hakeem MM. Insulin receptor substrate-1 (*IRS-1*) Gly927Arg: correlation with gestational diabetes mellitus in Saudi women. BioMed research international. 2014;2014:146495.
 19. Alharbi KK, Khan IA, Munshi A, Alharbi FK, Al-Sheikh Y, Alnbaheen MS. Association of the genetic variants of insulin receptor substrate 1 (*IRS-1*) with type 2 diabetes mellitus in a Saudi population. Endocrine. 2014 Nov 1;47(2):472-7.
 20. Angiolillo DJ, Bernardo E, Zannoni M, Vivas D, Capranzano P, Malerba G, et al. Impact of insulin receptor substrate-1 genotypes on platelet reactivity and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. Journal

- of the American College of Cardiology. 2011 Jun 28;58(1):30-9.
21. Almind K, Frederiksen SK, Ahlgren MG, Urhammer S, Hansen T, Clausen JO, et al. Common amino acid substitutions in insulin receptor substrate-4 are not associated with Type II diabetes mellitus or insulin resistance. *Diabetologia*. 1998 Jul 1;41(8):969-74.
22. Kahn CR, Vicent D, Doria A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annual review of medicine*. 1996 Feb;47(1):509-31.
23. Ferreira IA, Akkerman JWN. Chapter 2 IRS1 and Vascular Complications in Diabetes Mellitus. *Vitamins and Hormones*. 2005;70:25-66.
24. Yiannakouris N, Cooper JA, Shah S, Drenos F, Ireland HA, Stephens JW, et al. *IRS1* gene variants, dysglycaemic metabolic changes and type-2 diabetes risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2012 Dec 1;22(12):1024-30.
25. Jellema A, Zeegers MP, Feskens EJ, Dagnelie PC, Mensink RP. Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with Type 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. *Diabetologia*. 2003 Jul 1;46(7):990-5.
26. Koch M, Rett K, Volk A, Maerker E, Haist K, Deninger M, et al. Amino acid polymorphism Gly 972 Arg in *IRS-1* is not associated to lower clamp-derived insulin sensitivity in young healthy first degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. 1999;107(05):318-22.

Investigating the Association of Gly972Arg and Ala512Pro Polymorphism of IRS1 gene with Type 2 Diabetes in Sistan and Baluchistan Province

Ali Islami (MSc)¹, Ahmad Rashki (PhD)^{2*}, Seyyed Kazem Sabagh (PhD)³, Zahra Rashki Ghaleno (PhD)⁴

¹MSc Student in Genetics, Department of Biology, Faculty of Science, Zabol University, Zabol, Iran

²Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Zabol University, Zabol, Iran

³Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran

⁴Assistant Professor of Microbiology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences

Information	Abstract
Article Type: Original Article	Introduction: Type 2 diabetes is the most common type of diabetes and accounts for 90% of all diagnosed cases of diabetes. The <i>IRS1</i> gene (insulin receptor -1) acts as a mediator between insulin receptors and a complex network of messenger molecules in the muscle, liver and adipose tissue, and therefore may be an appropriate candidate for diabetes type 2. The aim of this study was to identify the association between known <i>IRS1</i> polymorphism (Gly972Arg and Ala512Pro) in a sample of type 2 diabetic patients compared with healthy subject. Methods: In this case-control study, a total of 100 patients with type 2 diabetes and 100 healthy individuals were enrolled to study. DNA extraction was performed using phenol-chloroform-proteinase K combination method. Determination of genotype of individuals was done by RFLP-PCR methods. The statistical analysis of the results was done using Chi-square test. Results: The results showed that the frequency of GG, GA and AA genotypes for polymorphism (Gly972Arg) rs1801278 was 82, 18 and 0 in patients and 85, 15 and 0 in healthy subjects. The results of statistical analysis showed that there was no significant difference between allelic and genotype frequency of Gly972Arg in patient with healthy controls. (P= 0.61). Also, Ala512Pro polymorphism was not found in Sistan and Baluchistan population. Conclusion: The statistical analysis of the results showed that the alleles of these two polymorphisms from the <i>IRS1</i> gene in the Sistan and Baluchistan population of Iran were not associated with the risk of type 2 diseases.
Article History: Received: 12 Oct. 2018 Accepted: 12 Jan. 2019	
Keywords: Type 2 Diabetes SNP <i>IRS1</i> Gene	
Corresponding Author: Ahmad Rashki Email: ah_rashki@usal.es Tel: +98-915-1970877 Fax: +98- 54-31232250 Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Zabol University, Zabol, Iran	

► Please cite this article as follows:

Islami A, Rashki A, Sabagh K, Rashki Ghaleno Z. Investigating the Association of Gly972Arg and Ala512Pro polymorphism of *IRS1* gene with type 2 diabetes in Sistan and Baluchistan Province. Journal of Jiroft University of Medical Sciences. 2018; 1 (3): 56-66.