pISSN:2345-5020
eISSN:2423-5571

مقاله اصیل پژوهشی

بررسی تنوع ژنتیکی در ژن *CYP3A4* و ارتباط آن با بیماری دیابت نوع ۲ در استان سیستان و بلوچستان

حمید حیدری قرائی[۱]، احمد راشکی[۲]، عباس بهاری[۳]، **زهرا راشکی قلعه نو*[۴]**

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانشیار میکروب شناسی و ژنتیک مولکولی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- استادیار بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۴- استادیار میکروب شناسی و ژنتیک مولکولی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

نویسنده مسئول: زهرا راشکی قلعه نو، دانشگاه علوم پزشکی زابل **zahrarashki@yahoo.co.uk**

چکیده

مقدمه و هدف: دیابت نوع ۲ به عنوان یک بیماری مزمن سبب ایجاد هزینه های اقتصادی و اجتماعی زیادی در دنیا می شود. امروزه ژن های متعددی در ارتباط با دیابت شناسایی شده است که یکی از آنها ژن *CYP3A4* می باشد که بر روی کروموزوم ۷ قرار گرفته و بیشترین تعداد سوبسترا در بین آنزیم های سیتوکروم p450 متعلق به آن می باشد. ژن *CYP3A4* در شبکه آندوپلاسمی همه بافت ها به جز مغز حضور دارد، هر چند که محل اصلی تجمع پروتئین آن درکبد و پروستات است. هدف اصلی پژوهش حاضر، بررسی ارتباط احتمالی بین واریانتهای خاصی در ژن *CYP3A4* با بیماری دیابت نوع ۲ بود.

مواد و روشها: در این مطالعه موردی - شاهدی نمونه های خون از ۱۰۰ فرد سالم و ۱۰۰ بیمار مبتلا مراجعه کننده به کلینیک دیابت علی اصغر زاهدان جمع آوری گردید. استخراج DNA با استفاده از روش ترکیب فنل-کلروفرم با پروتئیناز K انجام شد. تعیین ژنوتیپ افراد به وسیله تعیین توالی صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دهنده عدم وجود تفاوت های معنی داری (منجر به تغییر درکنفورماسیون پروتئین) در سطح توالی نوکلئوتیدی در ژن *CYP3A4* در بین نمونه های DNA بدست آمده از بیماران دیابتی نوع ۲ در مقایسه با نمونه های سالم بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده نشان دهنده عدم ارتباط اسنپ در ژن *CYP3A4* در جمیعت سیستان و بلوچستان ایران با خطر بروز بیماری دیابت نوع ۲ بود.

واژه‌های کلیدی: دیابت نوع ۲، ژن *CYP3A4*، تعیین توالی

Access This Article Online	
Quick Response Code:	Website: www.zbmu.ac.ir/jdn
	How to site this article: Heidari Gharaei H, Rashki A, Bahari A, Rashki Ghalehnoo Z. Study of Genetic Diversity in *CYP3A4* Gene and Its Association with Type II Diabetes in Sistan and Baluchestan Province. J Diabetes Nurs. 2018; 6 (3) :530-538

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۸

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021

مقدمه و هدف

دیابت نوع ۲ یک بیماری مزمن جدی است که سبب ایجاد هزینه های اقتصادی و اجتماعی زیادی در سرتاسر دنیا شده است. شیوع دیابت برای تمام گروه های سنی در سراسر دنیا ۲/۸ درصد تخمین زده شده و انتظار می رود که تا سال ۲۰۳۰ این میزان تقریباً دو برابر شود (۴/۴ درصد) (۱). شیوع دیابت به طور فزاینده ای در حال افزایش است، هر سال ۷ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می شوند و هر ۱۰ ثانیه یک نفر به دلیل عوارض این بیماری جان خود را از دست می دهد (۲). به علاوه تا سال ۲۰۲۵ بیشترین شیوع دیابت در کشورهای در حال توسعه اتفاق خواهد افتاد (۳). شیوع دیابت در جمعیت ایرانی سنین ۶۴-۱۵ سال ۸/۷ درصد تخمین زده شده است (۴). همچنین، شیوع دیابت نوع ۲ در جمعیت ایرانی ۴/۵-۴ درصد و در جمعیت بالای ۳۰ سال بیش از ۱۴ درصد می باشد (۵). ایران و دیگر کشورهای در حال توسعه با اپیدمی شیوع بیماری مواجه هستند. برخلاف بسیاری از بیماری‌های تک ژنی که فقط نقص در یک ژن علت اصلی بیماری است، در دیابت چندین ژن در ایجاد بیماری دخالت دارند که بعضی از ژن‌های درگیر هنوز شناسایی نشده‌اند. تا به امروز بیش از ۴۰ ژن مرتبط با این بیماری مشخص گردیده است. هر چند که ارتباط بیوشیمیایی آنها با بیماری برای همه ژنها هنوز کاملا روشن نیست. سیتوکروم p450 ها در سنتز برخی هورمون های جنسی مانند استروژن و پروژسترون نقش کلیدی دارند. همچنین در سنتز و متابولیسم کلسترول و ویتامین D نیز موثر هستند. اهمیت ویژه دیگر این آنزیم ها در متابولیسم مواد زنوبیوتیک به ویژه در کبد است (۶). مطالعات حاکی از ارتباط بین ژن *CYP3A4* و ابتلا به بیماری دیابت نوع ۲ در انسان است. مطالعه ای بر روی ۵۲۵۹ نفر در ژاپن نشان داد که جایگزینی اسید آمینه گوانین به جای آدنین در موقعیت ۱۳۹۸۹ در ژن *CYP3A4* با دیابت نوع ۲ ارتباط دارد (۷). در سال ۲۰۰۳ مطالعات دیگر ارتباط بین ژنوتیپ *CYP3A4* و سرطان پستان یا پروستات را نشان داده است (۸). در پژوهشی محققان نشان دادند که ۲۶ درصد بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ دارای موتاسیون‌های ژنتیکی در ژن گیرنده انسولین می‌باشند (۹).

در مطالعه ای که توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی ارتباط بین پلی مورفیسم های Gly482Ser و Thr528Thr این ژن و دیابت نوع ۲ در جمعیت چین جنوبی انجام شد گزارش کردند که تنها Gly482Ser دارای یک توزیع به طور معنی دار متفاوت بین بیماران دیابتیک و افراد سالم بوده و با دیابت نوع ۲ ارتباط داشت (۱۰).

بدین منظور شناسایی توالی این ژن در بیماران دیابتی و مقایسه آن با شاهد و بدست آوردن فراوانی ژنی در آن می تواند راهگشای تحقیقات آینده درباره عوامل ژنتیکی ابتلا به این بیماری باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی در ژن *CYP3A4* و ارتباط آن با بیماری دیابت نوع ۲ در استان سیستان و بلوچستان می باشد.

مواد و روش ها

تهیه نمونه ها

این مطالعه بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان کنترل انجام شد. افراد دیابتی از مراجعه کنندگان به کلینیک دیابت علی اصغر زاهدان و گروه کنترل از افراد سالم که معیارهای ابتلا به دیابت و سابقه فامیلی این بیماری را در اقوام درجه اول و دوم نداشتند بصورت تصادفی انتخاب شدند. ابتلا به دیابت با معیارهای سازمان بهداشت جهانی به صورت قند خون ناشتا (FBS) بالاتر از ۱۲۶ mg/dl یا قند دو ساعته پس از مصرف گلوکز (DGTT) بیشتر از ۲۰۰ mg/dl و با مصرف داروی ضد دیابت به تشخیص پزشک تعریف شد. نمونه گیری پس از ارائه آگاهی لازم و کسب رضایتنامه کتبی از افراد انجام گرفت.

نمونه گیری خون و تعیین ژنوتیپ

از هریک از افراد مورد مطالعه به میزان ۵ میلی لیتر خون محیطی در لوله های حاوی EDTA گرفته شد. سپس DNA با استفاده از روش ترکیب فنل-کلروفرم با پروتئیناز K مطابق پروتکل زیر استخراج شد. ابتدا ۴۰۰ میکرولیتر از خون افراد با یک میلی لیتر بافر سرد تجزیه گلبول قرمز (ساکاروز ۳۲ درصد مولار، ۱۰Tris-Hcl میلی مولار (pH=7.5)، $MgCl_2$ ۵ میلی مولار و ۱ درصد Triton-

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021

X100) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. نمونه های مخلوط شده با بافر لیز کننده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از خاتمه سانتریفوژ محلول رویی دور ریخته شد و به لخته باقیمانده مجددا ۱ میلی لیتر بافر سرد تجزیه گلبول قرمز اضافه و با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر بافر تجزیه گلبول سفید (NaCl/EDTA) به همراه ۳۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۲۵ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری گردید (SDS به حل شدن لیپید ها و پروتئیناز K به شکستن پروتئین ها و هیستون ها کمک می کند). متعاقبا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر فنل اشباع شده به هر لوله اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. در این مرحله، محلول رویی به تیوب جدید منتقل و به همان میزان کلرفرم/ایزوآمیل الکل اضافه و به آرامی مخلوط و مجددا 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 یک و نیم برابر حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

تیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی تخلیه و رسوب حاصله با ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد سرد شستشو داده شد. پس از خشک شدن الکل، رسوب داده شده با ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل و تا انجام مراحل بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

انجام PCR و تعیین توالی

برای انجام این واکنش ابتدا توالی ژن *CYP3A4* از سایت NCBI مشخص و توسط نرم افزار های CLC Main Workbench و نرم افزارهای آنلاین مانند IdtDNA oligo analyzer و Primer 3 طراحی پرایمرها از نظر محل اتصال و دارا بودن ویژگی های مطلوب مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت و نیز توسط NCBI Blast از یکتا بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل شد (جدول ۱).

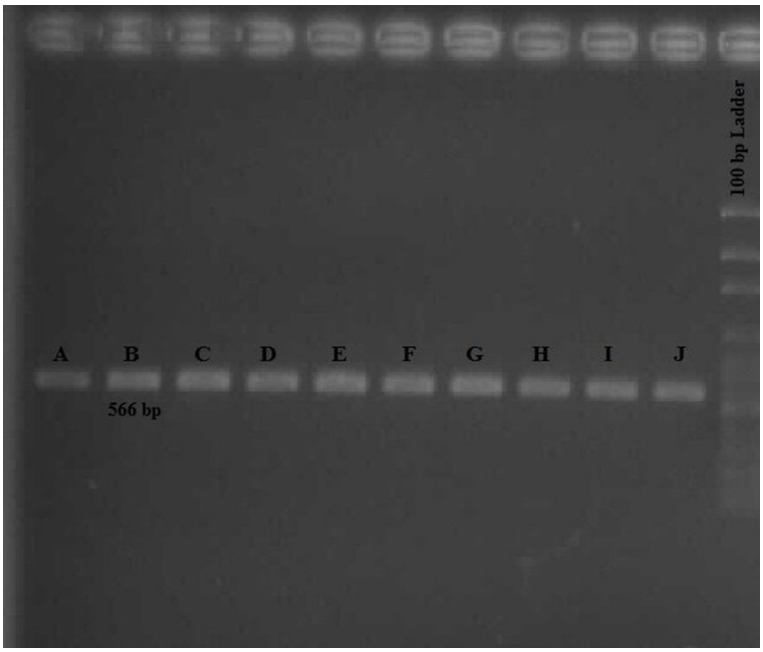
جدول شماره ۱: مشخصات آغازگرهای ژن *CYP3A4* مورد استفاده در این تحقیق

Forward Primer	Revers Primer
CCCCACACAAATA CATCC	CACAAAACACAAC ACCAC
GC% = 50.0	GC% = 44.44
TM: 53.9	TM: 51.6

آغازگرها با میانجی گری شرکت پیشگام، از شرکت کره تهیه و به صورت لیوفیلیزه خریداری شد. به منظور به دست آوردن دمای اپتیمم اتصال آغازگرهای واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با شیب دمایی از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf (آلمان) استفاده و دمای ۵۶ درجه در نظر گرفته شد. برای انجام PCR، ۲میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از آنزیم 2×Master Mix RED (شرکت پیشگام) و یک میکرولیتر از پرایمر های Forward و Reverse (۲۰پیکومول در میکرولیتر) را با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی آن با آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل: واسرشتگی ثانویه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر ها به DNA الگو در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

پس از انجام واکنش، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد. قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر ۱۰۰ جفت باز ارزیابی شد (شکل ۱).

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021



شکل شماره ۱: نمونه PCR ژن *CYP3A4* در افراد سالم (A-E) و افراد بیمار (F-J)

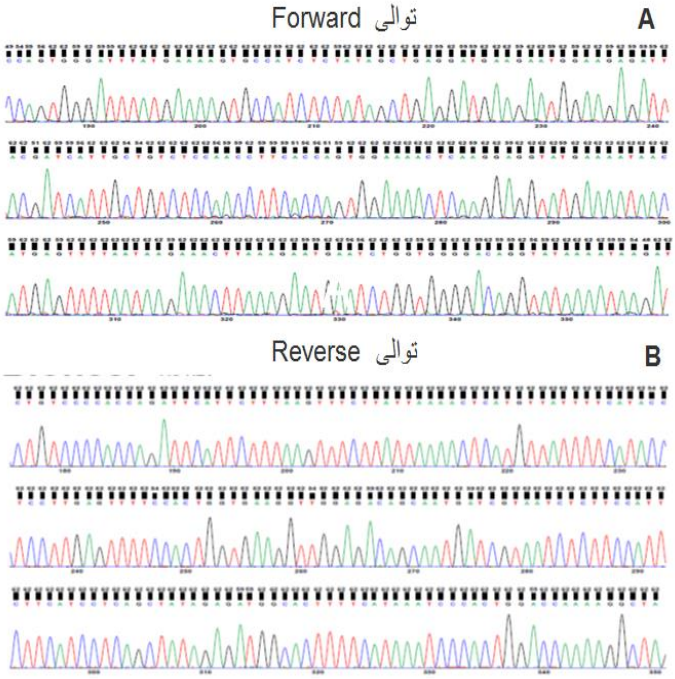
سپس محصول PCR برای انجام واکنش تعیین توالی از طریق شرکت تکاپو زیست به کشور کره فرستاده شدند و با دستگاه ABI (capillary system) 3730 XL تعیین توالی شدند. واکنش تعیین توالی برای اطمینان بیشتر، با پرایمر برگشت (Reverse) هم انجام شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزارهای Chromas، DNAstar و Gene runner آنالیز (شکل ۲) و پس از تصحیح با توالی مرجع در سایت NCBI، توسط نرم افزار ClustalW همردیف شدند.

یافته ها

در این پژوهش، ۱۰۰ نمونه خون محیطی افراد بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۱۰۰ نمونه خون محیطی افراد سالم جمع آوری گردید. دو گروه بیماران و کنترل از نظر جنسیت و سن یکسان انتخاب شدند. در این پژوهش در گروه بیماران، تعداد ۴۰ نفر مرد و ۶۰ نفر زن و در گروه افراد سالم تعداد ۴۵ نفر مرد و ۵۵ نفر زن بودند.

در مطالعه حاضر در ۱۰ نمونه DNA حاصل از خون افراد دیابتی به همراه ۱۰ نمونه DNA حاصل از خون افراد سالم توسط تکنیک PCR جهت بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت

در هر مورد وجود باند اختصاصی با اندازه مورد نظر و فقدان باندهای اضافی، موید موفقیت آمیز بودن نتایج PCR می باشد (شکل ۱).



شکل شماره ۲. هالوگرام تعیین توالی شده قسمتی از ژن *CYP3A4*

نتایج حاصل از تعیین توالی و همردیف سازی آن با استفاده از نرم افزار ClustalW، نشان داد که توالی این ژن در تمام نمونه ها(بیمار و کنترل) کاملا یکسان بود (شکل ۳).

```
بیمار5      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 173
بیمار2      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 180
کنترل7      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 169
کنترل6      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 169
کنترل9      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 172
بیمار3      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 173
کنترل1      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 180
GRCh38      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 180
کنترل5      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 173
بیمار1      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 180
بیمار6      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 180
کنترل8      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 180
بیمار7      ACATAAAGATAAAAGACCATTTTTAGGCAGCTCAAATTCAGTGGACTACCCCTTGGAAAG 180
            ************************************************************

کنترل4      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 229
بیمار4      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 229
کنترل2      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 229
بیمار9      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 232
کنترل3      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 228
کنترل10     GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 228
بیمار8      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 227
بیمار10     GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 232
بیمار5      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 233
بیمار2      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 240
کنترل7      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 229
کنترل6      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 229
کنترل9      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 232
بیمار3      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 233
کنترل1      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 240
GRCh38      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 240
کنترل5      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 233
بیمار1      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 240
بیمار6      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 240
کنترل8      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 240
بیمار7      GGACTGTGATCTTATTTTATACCTGTCCCCACCAGATTCATTCTTTAAGTTTCTTATTAA 240
            ************************************************************

کنترل4      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 289
بیمار4      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 289
کنترل2      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 289
بیمار9      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 292
کنترل3      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 288
کنترل10     AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 288
بیمار8      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 287
بیمار10     AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 292
بیمار5      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 293
بیمار2      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 300
کنترل7      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 289
کنترل6      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 289
کنترل9      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 292
بیمار3      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 293
کنترل1      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 300
GRCh38      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 300
کنترل5      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 293
بیمار1      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 300
بیمار6      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 300
کنترل8      AACTCATGTTATTTTCATACCTCCTTGAGTTTTCCACTGGTGAAGGTTGGAGACAGCAAT 300
```

شکل شماره ۳. نمونه همردیفی توالی ژن *CYP3A4* افراد بیمار و سالم با استفاده از نرم افزار ClustalW

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021

بحث و نتیجه گیری

با وجود مطالعات ژنتیکی وسیع انجام شده، نتایج روشنی در مورد ژن ها و اسنپ‌های مرتبط با بیماری دیابت نوع ۲ به دست نیامده است. در مطالعه Yamada و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی ۱۶۴۰ بیمار دیابتی با استفاده از روش تعیین توالی، مشخص گردید که پلی مورفیسم جایگزینی گوانین به جای آدنین در موقعیت ۱۳۹۸۹ در ژن *CYP3A4* با محافظت در برابر ابتلا به دیابت نوع ۲ همبستگی دارد(۱۱). Wang و همکاران در سال ۲۰۱۲ و همچنین Yamada، با بررسی ژن *CYP3A4* در بین بیماران پیوند کلیوی با استفاده از روش تعیین توالی نشان دادند که ژنوتیپ CYP3A4*1G/*1G باعث افزایش خطر ابتلا به رد پیوند می باشد (۱۱, ۱۲). همچنین Ruzilawati و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی ژن *CYP3A4* در بین ۱۲۱ نفر افراد سالم با استفاده از تکنیک PCR-RFLP نشان دادند که جهشی برای آلل CYP3A4*4 و CYP3A4*5 وجود نداشته و برای آلل CYP3A4*18 وجود دارد (۱۳, ۱۴).

مطالعات دیگر بطور همزمان بر روی ارتباط دو ژن *TCF7L2* و *CYP3A4* با حساسیت به دیابت نوع دو نشان داد که بیمارانی که در موقعیت rs12255372 هموزیگویتی TT داشتند نسبت به افرادی که واجد هتروزیگوس TG یا GG بودند پس از گذشت دو ساعت از تست مقاومت به گلوکز (GTT) غلظت انسولین کمتری داشتند(۱۵). تحقیقات زیادی در ارتباط با این ژن و دیابت نوع ۲ گزارش شده است و گزارشات بالا بخشی از آنها را نشان می دهد. نتایج تعیین توالی تحقیق حاضر بیانگر این بود که تفاوت معنی داری در سطح توالی نوکلئوتیدی در ژن *CYP3A4* در بین نمونه های DNA بدست آمده از بیماران دیابتی نوع ۲ در مقایسه با نمونه های سالم که منجر به تغییر درکنفورماسیون پروتئین گردد وجود نداشت که نتایج حاصل با نتایج Ruzilawati و Bustos همکاران مطابقت دارد(۱۳, ۱۶). با توجه به اینکه در این بررسی، اسنپ در ژن *CYP3A4* در هیچکدام از افراد مورد مطالعه یافت نشد می‌توان گفت که این اسنپ کمیاب و یا احتمالا غایب، نقشی در بروز دیابت نوع ۲ در این جمعیت ندارد. اگرچه توزیع و تاثیرگذاری بسیار متفاوت این اسنپ در جوامع مختلف نشان داده شد (۱۷, ۱۸). در مطالعات انجام شده دیگری به صورت متا آنالیز بروی تعداد زیادی از افراد هم، در بیشتر موارد ارتباطی بین اسنپ‌های این ژن با بیماری دیابت نوع ۲ یافت نشد (۱۹, ۲۰). که می تواند فرضیه احتمال ارتباط اسنپ‌ها به ویژه اسنپ‌های غیر شایع را با این بیماری رد کند. بنابراین در این گونه مطالعات ممکن است با انتخاب نمونه‌هایی با رده سنی بالا، نتایج مطمئن‌تری به دست آید. لذا بررسی ژنتیکی این بیماری و شناسایی لوکوس‌ها و ژن‌های دخیل در آن اسباب پیش گیری موثری را فراهم نموده و سبب شناخته شدن احتمالی اتیولوژی و مکانیسم‌های درگیر در این بیماری خواهد بود. با توجه به دقت روش تعیین توالی محصول PCR نمونه انتخابی در جمیعت مورد مطالعه، می‌توان پیشنهاد کرد که نتایج به دست آمده در این مطالعه مبنی بر عدم وجود اسنپ در ژن *CYP3A4*، ممکن است دلیل بر توزیع متفاوت اسنپ‌ها در جمعیت‌های مختلف جهانی باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان نامه حمید حیدری قرائی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه زابل با کد اخلاق IR-UOZ-92. 11 می باشد. بدین وسیله از اساتید و کارکنان دانشکده دامپزشکی و گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه زابل که امکانات لازم را برای انجام این پژوهش فراهم نموده اند سپا سگزاری می شود. ضمنا هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021

References

1. Russell-Minda E, Jutai J, Speechley M, Bradley K, Chudyk A, Petrella R. Health technologies for monitoring and managing diabetes: a systematic review. Journal of Diabetes Science and Technology. 2009; 3(6): 1460-71.
2. Zolfaghari M, Mousavifar S, Haghani H. Mobile phone text messaging and telephone follow-up in Iranian type 2 diabetic patients for 3 months: a comparative study. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders. 2009; 11(1): 7.
3. Ziaei-Rad M, Vahdaninia M, Montazeri A. Sexual dysfunctions in patients with diabetes: a study from Iran. Reproductive Biology and Endocrinology. 2010; 8(1): 50.
4. Ghaderpanahi M, Fakhrzadeh H, Sharifi F, Mirarefin M, Ebrahim RP, Ghotbi S, et al. Association of physical activity with risk of type 2 diabetes. Iranian Journal of Public Health. 2011; 40(1): 86.
5. Baghianimoghadam M, Ardekani M, Baghianimoghadam B. Effect of education on improvement of quality of life by SF-20 in type 2 diabetic patients. Acta Medica Indonesiana. 2009; 41(4): 175-80.
6. Zaied C, Abid S, Mtiraoui N, Zellema D, Achour A, Bacha H. Cytochrome P450 (CYP3A4*18) and glutathione-S-transferase (GSTP1) polymorphisms in a healthy Tunisian population. Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2012; 16(10): 1184-7.
7. Yamada Y, Matsuo H, Watanabe S, Kato K, Yajima K, Hibino T, et al. Association of a polymorphism of CYP3A4 with type 2 diabetes mellitus. International Journal of Molecular Medicine. 2007; 20(5): 703-7.
8. Kadlubar FF, Berkowitz GS, Delongchamp RR, Wang C, Green BL, Tang G, et al. The CYP3A4*1B variant is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2003; 12(4): 327-31.
9. Kazemi B, Seyed N, Moslemi E, Bandehpour M, Bikhof Torbati M, Saadat N, et al. Insulin receptor gene mutations in iranian patients with type II diabetes mellitus. Iranian Biomedical Journal. 2009; 13(3): 161-8.
10. Wang S, Zhang R, Wang T, Jiang F, Hu C, Jia W. Association of the genetic variant rs2000999 with haptoglobin and diabetic macrovascular diseases in Chinese patients with type 2 diabetes. Journal of Diabetes and its Complications. 2018; In Press.
11. Yamada Y, Kato K, Yoshida T, Yokoi K, Matsuo H, Watanabe S, et al. Association of polymorphisms of ABCA1 and ROS1 with hypertension in Japanese individuals. International Journal of Molecular Medicine. 2008; 21(1): 83-9.
12. Wang YY, Zhang M, Lu FM, Jiao Z, Qiu XY. CYP3A4 genetic polymorphisms predict cyclosporine-related clinical events in Chinese renal transplant recipients. Chinese Medical Journal. 2012; 125(23): 4233-8.
13. Ruzilawati AB, Gan SH. CYP3A4 genetic polymorphism influences repaglinide's pharmacokinetics. Pharmacology. 2010; 85(6): 357-64.
14. Ruzilawati AB, Suhaimi AW, Gan SH. Genetic polymorphisms of CYP3A4:

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021

CYP3A4*18 allele is found in five healthy Malaysian subjects. Clinica Chimica Acta. 2007; 383(1-2): 158-62.

15. Potapov VA, Shamkhalova MN, Smetanina SA, Bel'chikova LN, Suplotova LA, Shestakova MV, et al. Polymorphic markers TCF7L2 rs12255372 and SLC30A8 rs13266634 confer susceptibility to type 2 diabetes in a Russian population. Genetika. 2010; 46(8): 1123-31.

16. Bustos ML, Caritis SN, Jablonski KA, Reddy UM, Sorokin Y, Manuck T, et al. The association among cytochrome P450 3A, progesterone receptor polymorphisms, plasma 17-alpha hydroxyprogesterone caproate concentrations, and spontaneous preterm birth. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2017; 217(3): 369-e1.

17. Woillard JB, Mourad M, Neely M, Capron A, van Schaik RH, van Gelder T, et al. Tacrolimus Updated Guidelines through popPK Modeling: How to Benefit More from CYP3A Pre-emptive genotyping prior to kidney transplantation. Frontiers in Pharmacology. 2017; 8: 358.

18. Choi SW, Lam DM, Wong SS, Shiu HH, Wang AX, Cheung CW. Effects of single nucleotide polymorphisms on surgical and postsurgical opioid requirements: a systematic review and meta-analysis. The Clinical Journal of Pain. 2017; 33(12): 1117-30.

19. Gravel S, Chiasson JL, Dallaire S, Turgeon J, Michaud V. Evaluating the impact of type 2 diabetes mellitus on CYP450 metabolic activities: protocol for a case-control pharmacokinetic study. BMJ Open. 2018; 8(2): e020922.

20. Elfaki I, Mir R, Almutairi FM, Duhier FM. Cytochrome P450: polymorphisms and roles in cancer, diabetes and atherosclerosis. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2018; 19(8): 2057-70.

Journal of Diabetes Nursing **Received: 18/7/2018**

pISSN: 2345-5020 **Accepted: 20/10/2018**

eISSN: 2423-5571 Volume **6** Number **3** p: **530-538**

Study of Genetic Diversity in *CYP3A4* Gene and Its Association with Type II Diabetes in Sistan and Baluchestan Province

Heidari Gharaei Hamid [1], Rashki Ahmad [2], Bahari Abbas [3], **Rashki Ghalehnoo Zahra [4*]**

1. MSc in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Associate Professor of Microbiology and Molecular Genetics, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Assistant Professor of Biotechnology, Department of Biotechnology, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran
4. Assistant Professor of Microbiology and Molecular Genetics, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

***Corresponding author**: Zahra Rashki Ghalehnoo, Zabol University of Medical Sciences. **Email**: zahrarashki@yahoo.co.uk

Downloaded from jdn.zbmu.ac.ir at 15:35 +0430 on Wednesday June 16th 2021

Abstract

Introduction: Type II diabetes is a chronic disease that causes many economic and social costs all over the world. Currently, different genes are known to have associations with diabetes, one of which is *CYP3A4* gene on chromosome 7. This gene belongs the largest number of substrates regarding cytochrome p450 enzymes. *CYP3A4* gene is found in endoplasmic reticulum of all tissues except brain; however, the main source of its protein accumulates in the liver and prostate. The main purpose of the present study is to investigate whether there is any predictable associations between specific variants of *CYP3A4* gene and type II diabetes.

Materials and Methods: In this case-control study, 100 blood samples of healthy individuals as well as 100 blood samples of patients referring to diabetes clinic of Ali Asghar in Zahedan were collected. DNA extraction was performed using phenol-chloroform method combined with proteinase K. The determination of individuals' genotype was done by a sequencing method.

Results: The results of the study showed no significant differences (causing to alter protein conformation) between DNA samples of type two diabetic patients and those of healthy samples in terms of nucleotide sequence in *CYP3A4* gene.

Conclusion: With regard to the statistical analysis of the results, it can be concluded that there is no associations between *SNPs* in *CYP3A4* gene and the risk of type II diabetes in the population of Sistan and Baluchestan province in Iran

Keywords: Type II diabetes, *CYP3A4* Gene, Sequencing

Access This Article Online	
Quick Response Code:	Website: www.zbmu.ac.ir/jdn
	How to site this article: Heidari Gharaei H, Rashki A, Bahari A, Rashki Ghalehnoo Z. Study of Genetic Diversity in *CYP3A4* Gene and Its Association with Type II Diabetes in Sistan and Baluchestan Province. J Diabetes Nurs. 2018; 6 (3) :530-538