

# بررسی پلی مورفیسم $rs4612666$ در ژن $NLRp3$ در بیماران دیابت نوع ۲ در آذربایجان شرقی

فاطمه حسین پور شوردرق<sup>۱</sup>، حسین سلطانزاده<sup>۲\*</sup>، منوچهر قوجایی<sup>۲</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** دیابت نوع دو، یک بیماری شایع چند فاکتوری است. مطالعات نشان داده است که ژن  $NLRp3$  نقش مهمی در مقاومت به انسولین دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی همراهی پلی مورفیسم های  $rs4612666$  از ژن  $NLRp3$  با دیابت نوع دو در جمعیت استان آذربایجان شرقی می باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه موردی - شاهدی، نمونه خون از ۱۱۰ نفر بیمار و ۱۱۰ نفر سالم به عنوان گروه کنترل جمع آوری شد. به دنبال استخراج DNA از تمام نمونه ها و سنجش کیفیت با استفاده از الکتروفورز، نمونه ها با پرایمرهای اختصاصی خود با PCR و الکتروفورز بررسی شدند. تعیین ژنوتیب افراد برای  $rs4612666$  با استفاده از روش PCR-RFLP انجام شد. داده های حاصل شده با نرم افزار SPSS version 16 وسط آزمون توصیفی و  $\chi^2$  مورد بررسی قرار گرفت و سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

**نتایج:** آنالیز نتایج بین دو گروه سالم و بیمار، از نظر آماری یک اختلاف معنی داری ( $p < 0/05$ ) را در فراوانی ژنوتیب های CC، TT و TC مربوط به پلی مورفیسم  $rs4612666$  در موقعیت ژن  $NLRp3$  نشان داد ( $p = 0/000$ ). درصد آلل T نیز در افراد سالم و بیمار به ترتیب ۶۵/۹ درصد و ۴۵/۹ درصد و درصد آلل C در افراد سالم و بیمار به ترتیب ۳۴/۱ درصد و ۵۴/۱ درصد گزارش شد. **نتیجه گیری:** نتایج در این مطالعه نشان می دهد که احتمالاً بین افزایش آلل C و ابتلا به دیابت می تواند رابطه وجود داشته باشد اگر چه برای تایید این نتایج نیاز به انجام مطالعات گسترده می باشد.

**واژه های کلیدی:** پلی مورفیسم  $rs4612666$ ، دیابت نوع ۲، ژن  $NLRp3$

**ارجاع:** حسین پور شوردرق، فاطمه، سلطانزاده حسین، قوجایی منوچهر. بررسی پلی مورفیسم  $rs4612666$  در ژن  $NLRp3$  در بیماران دیابت نوع ۲ در آذربایجان شرقی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۱۲): ۴۴۰۵-۱۴.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب، بناب، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب، دانشکده علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۴۳۲۱۲۶۷۹، پست الکترونیکی: Hossien4040@gmail.com، صندوق پستی: ۴۴۸۰

## مقدمه

دیابت نوع دو یک بیماری شایع چند فاکتوری و هتروژنی می‌باشد (۱). این بیماری نوعی اختلال در سوخت و ساز بدن است که با مقاومت بدن به انسولین همراه است (۲). در افراد مبتلا به دیابت نوع دو، با این که مقدار انسولین در خون از مقدار طبیعی بیش‌تر است، ولی تعداد گیرنده‌های انسولین کم است (۳). اخیراً از طریق مطالعات گسترده ارتباط ژنومی بیماری دیابت نوع دو با چندین ژن نشان داده شده است (۴). از آنجایی که دیابت شیوع بالایی در همه کشورها دارد به طبع هزینه بالایی نیز بر بهداشت و درمان داشته، پس شناخت، پیشگیری و درمان آن حایز اهمیت می‌باشد (۵). اینفلامازوم (Inflammasomes) مجموعه پروتئینی سیتوپلاسمی هستند که سیگنال‌های مختلف استرس را تشخیص می‌دهند. این پروتئین‌ها ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی را تنظیم کرده و از اعضای مهم واکنش‌های التهابی ایمنی می‌باشند. از جمله Inflammasomes می‌توان به *NLRP3 inflammasome* اشاره کرد که در جایگاه q441 قرار دارد (۶). گزارش شده است که این ژن با بسیاری از بیماری‌های التهابی ایمنی مانند نقرس، سکنه مغزی ایسکمیک، فشارخون، مقاومت انسولینی، استوماتیس آفتی مجدد و اسپوندیلوآرتریس (spondyloarthritis) نوجوانان مرتبط است (۷). التهاب *NLRP3* به‌طور خاص از محصولات پروتئینی ژن‌های *NLRP3*، *PYCARD* و *CASPI* تشکیل شده است (۸). در حالت عادی فعال‌سازی *NLRP3* به واسطه الیگومریزاسیون پروتئین آدپتور عضوی از خانواده کاسپاز (کدگذاری شده توسط ژن *CARD8*) کنترل می‌شود. به علاوه این پروتئین در فعال‌سازی کاسپاز ۱- نقش داشته و تجزیه پیش‌سازهای اینترلوکین-1B و اینترلوکین-18 به سایتوکاین‌های فعال زیستی را کنترل می‌کند که القای پاسخ‌های التهابی پایین دستی را باعث می‌شود (۹). از آنجا که التهاب یک پاسخ فیزیولوژیکی طبیعی برای حذف عوامل تهاجمی و محرک‌های خارجی است با این وجود التهاب بیش از حد ممکن است به سلول‌های سالم آسیب رسانده و منجر به بیماری‌های مزمن

شود. بنابراین سلول‌های ایمنی برای کمک به حفظ تعادل در التهاب، از ماشین مولکولی به نام *NLRP3 inflammasome* استفاده می‌کنند. *NLRP3* در سلول سالم غیرفعال است، اما زمانی که میتوکندری سلول توسط استرس یا مواجهه با سموم باکتریایی آسیب ببیند، روشن می‌شود (۱۰). پلی مورفیسم یا (Single Nucleotide polymorphism) SNP به تفاوت‌های فردی ژنتیکی که با استعداد ابتلا به برخی بیماری‌ها در ارتباط باشند گفته می‌شود. مطالعه‌های ژنتیکی قومی و منطقه‌ای در زمینه اختلافات تک نوکلئوتیدی می‌تواند مبنای تشخیص و درمان فارماکولوژیک برخی از انواع بدخیمی‌ها شود. نتایج حاصل از مطالعات GWAS (Genome Wide Association Studies) حاکی از آن بوده که واریانت‌های ژنی بسیاری موسوم به تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی SNP وجود دارند که می‌توانند با استعداد ابتلا به دیابت در ارتباط باشند بررسی این پلی مورفیسم‌ها یا تفاوت‌های فردی ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف می‌تواند قدرت تشخیص را بسیار افزایش دهد. با توجه به مطالب ذکر شده، با عنایت به این موضوع که یکی از اهداف مطالعات جمعیتی و پلی مورفیسم، به‌عنوان یک فاکتور پیش‌آهنگی دهنده است، لذا هدف از مطالعه این پژوهش تعیین فراوانی پلی مورفیسم ژن *NLRP3* در موقعیت rs4612666 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در آذربایجان شرقی می‌باشد.

## روش بررسی

در این مطالعه موردی-شاهدی، نمونه خونی از ۱۱۰ نفر بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ به حجم ۳ CC که توسط پزشک متخصص تایید شده بود و هم‌چنین ۳ CC خون ۱۱۰ فرد سالم بدون هر گونه پیشینه دیابت به‌عنوان گروه شاهد، که از لحاظ مشخصات سنی، جنسیت و منطقه جغرافیایی با یکدیگر مطابقت داشتند از آزمایشگاه تامین اجتماعی شهرستان بناب، جمع‌آوری گردید. از هر یک از افراد ۳ CC نمونه خونی گرفته شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد در داخل لوله‌های حاوی مواد ضد انعقاد EDTA نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی افراد مورد

گرفت. برنامه PCR برای انجام تکنیک PCR-RFLP در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از اتمام واکنش PCR، الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ انجام گردید. شایان ذکر است که پرایمرهای مورد استفاده در این روش با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner version 4.0.3 (Beta) طراحی و اختصاصیت پرایمرها توسط سایت NCBI در Primer Blast تأیید شد.

#### تیمار محصولات PCR با آنزیم محدود کننده Mob1

در نهایت محصولات حاصل از PCR با حضور آنزیم Mob1 تحت هضم قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا به اندازه ۶ میکرولیتر از محصول PCR یکی از نمونه‌ها به داخل میکروتیوب ریخته شد، سپس ۱۱ میکرولیتر آب دیونیزه به آن افزوده شد و هم‌چنین به اندازه ۲ میکرولیتر از بافر و ۱ میکرولیتر از آنزیم به داخل آن اضافه شد. این مراحل برای سایر نمونه‌ها هم تکرار شد و در نهایت میکروتیوب در داخل بن ماری در دمای ۳۰ C به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. برای مشاهده قطعات برش داده شده با آنزیم، ژل آگاروز تهیه و پس از رنگ‌آمیزی به دستگاه ترانس ایلومیناتور منتقل شد و باندهای حاوی قطعات برش داده شده مشاهده و عکس‌برداری شد.

مطالعه مطابق روش کیت استخراج BioBasic ساخت کشور کانادا انجام گرفت.

#### انجام PCR بر روی DNA استخراج شده از نمونه‌های خون

در مطالعه حاضر به منظور تعیین ژنوتیپ افراد از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز یک درصد کیفیت سنجی شد. جهت انجام PCR، ابتدا پرایمرهای مستقیم و معکوس (جدول ۱) به مقدار توصیه شده توسط شرکت سازنده به غلظت ۱۰۰ میکرومولار رقیق‌سازی شد، سپس برای تهیه غلظت کاری پرایمرها بعد از انجام رقت غلظت پرایمرها، غلظت ۱ به ۱۰ برای انجام آزمایش انتخاب شد. برای انجام واکنش PCR طبق پروتکل شرکت سازنده Master Mix AMPLIQON) میکرولیتر از Master Mix، ۱/۵ میکرولیتر هر کدام از پرایمرهای مستقیم و معکوس و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه به همان میکروتیوب منتقل شد و محتویات آن یک دور کوتاه به آرامی اسپین گردید. سپس به داخل آن ۲ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب DNA استخراج شده منتقل شده و یک دور کوتاه به آرامی اسپین گردید. نهایتاً میکروتیوب با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر مدل BIO RAD ساخت کشور آمریکا قرار

جدول ۱: پرایمر مستقیم و معکوس مربوط به ژن *NLRp3*

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول (جفت باز)
مستقیم	5'-CAGGACAATGACAGCATCGGGTGTGAT-3'	۲۸
معکوس	5'-GCTGCCATAAAAATTTCACATAA-3'	۲۳

جدول ۲: برنامه PCR به منظور تکثیر پلی‌مورفیسم ۱۲۶۶۶۱۴۶۶

سیکل	زمان	دما (°C)	مراحل
۱	۱۰ دقیقه	۹۴°C	دناتوراسیون اولیه
۳۰	۳۰ ثانیه	۹۴°C	دناتوراسیون
۳۰	۳۰ ثانیه	۵۷°C	دمای اتصال
۳۰	۳۰ ثانیه	۷۲°C	طویل سازی
۱	۵ دقیقه	۷۲°C	طویل سازی نهایی
-	∞	۴°C	نگهداری

## تجزیه و تحلیل آماری

تمام محاسبات و تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد. وضعیت هموزیگوت و هتروزیگوت‌ها به منظور بررسی احتمال ارتباط شان با بیماری تحت آزمون Chi-Square قرار گرفتند. توزیع ژنوتیپ برای SNP‌های مورد مطالعه محاسبه و برای تعیین انحراف از تعادل هاردی واینبرگ از آزمون chi-square با درجه آزادی (df) یک بررسی شد. در تحلیل نتایج سطح ( $p < 0.05$ ) به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب تایید شده است (کد اخلاق IR.IAU.TABRIZ.REC.1398.103). شایان ذکر است در مطالعه حاضر تمامی افراد شرکت‌کننده در مورد تحقیق حاضر توجیه شدند و تمامی ملاحظات اخلاق پزشکی از جمله تکمیل پرسش‌نامه، اخذ رضایت نامه کتبی از بیماران، کد اخلاق پزشکی و انجام درست خون‌گیری رعایت گردید.

## نتایج

## نتایج بررسی اطلاعات دموگرافیک بیماران

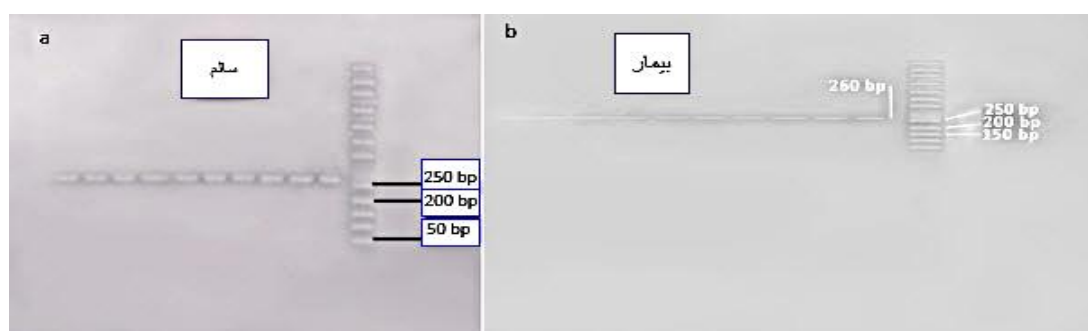
۱۱۰ نمونه خون مربوط به افراد مبتلا به دیابت و نمونه خون سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شد. در این مطالعه ۳۹/۳

درصد مذکر و ۶۰/۷ درصد مونث هستند و میانگین سنی در میان آن‌ها ۵۲ سال است. در میان نمونه‌های مذکر ۳۷ درصد سالم و ۶۳ درصد دیابتی بودند و در میان نمونه‌ها مونث ۱۸ درصد سالم و ۸۲ درصد دیابتی بودند. پارامترهای دموگرافیک و بالینی در بیماران با سه ژنوتیپ با هم مورد بررسی قرار گرفت و اختلاف معناداری بین این پارامترها و ژنوتیپ بیماران مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

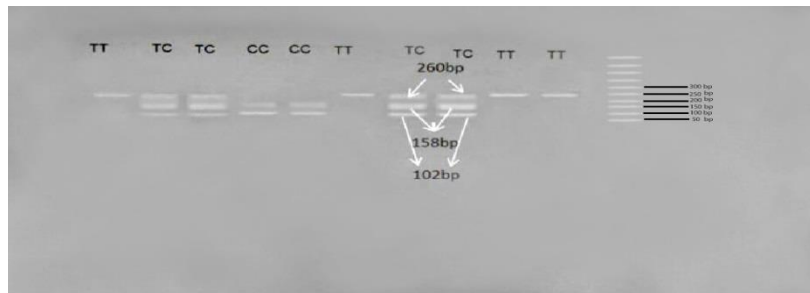
نتایج الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های افراد سالم و بیمار به دنبال استفاده از پرایمرهای ژن *NLRp3* اندازه محصول مورد نظر ۲۶۰ جفت باز به دست آمد که در فاصله بین باندهای ۲۵۰ و ۳۰۰ جفت بازی از لدر تشکیل شد. لدر مورد استفاده ۵۰ جفت بازی می‌باشد (شکل ۱).

نتایج الکتروفورز محصولات PCR اثر داده شده با آنزیم محدودکننده *Mob1*

در صورت تبدیل آلل C به T، این آنزیم جایگاه برش نداشته و قطعه ۲۶۰ جفت بازی برش نخواهد یافت. در صورت هموزیگوت بودن C، دو قطعه ۱۵۸ و ۱۰۲ جفت بازی ایجاد می‌شود، هموزیگوت بودن T، یک قطعه ۲۶۰ جفت بازی و در صورت هتروزیگوت بودن، ۳ قطعه ۲۶۰، ۱۵۸ و ۱۰۲ جفت بازی خواهیم داشت (شکل ۲).



شکل ۱: نمونه ژل الکتروفورز محصولات PCR قبل از تاثیر آنزیم محدودکننده *Mob1* که تصویر a و b به ترتیب مربوط به گروه سالم و گروه بیمار است. طول قطعه مورد برابر ۲۶۰ bp می‌باشد که در تصاویر ژل قابل مشاهده است. شایان ذکر است که لدر مورد استفاده ۵۰ bp می‌باشد.



شکل ۲: نمونه نتایج الکتروفورز محصول PCR تیمار شده با آنزیم Mob1 در افراد مبتلا به دیابت

### بررسی آماری ژنوتیپ‌ها

بر روی داده‌های حاصل از فراوانی ژنوتیپ‌ها، آزمون کای اسکوئر (chi-square) انجام گرفت که بیشترین فراوانی در گروه سالم متعلق به ژنوتیپ TT و در گروه بیمار متعلق به TC می‌باشد. نتایج این آزمون نشان می‌دهد بین فراوانی ژنوتیپ‌ها در بین گروه افراد سالم و گروه بیمار اختلاف معنی‌داری وجود دارد، زیرا سطح معنی‌داری به دست آمده برابر ۰/۰۰۰ می‌باشد ( $p < ۰/۰۵$ ). نتایج این آزمون در جدول ۳ و نمودار ۱ آورده شده است. سه نوع ژنوتیپ مورد نظر در این تحقیق شامل TT، CC و TC بود که فرکانس‌های آن‌ها در جامعه هدف مورد مطالعه در این تحقیق که از ۱۱۰ نفر سالم و ۱۱۰ نفر بیمار تشکیل شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CC و TC در افراد سالم به ترتیب ۵۴/۴۵٪، ۲۲/۷۲٪ و ۲۲/۷۲٪ مورد و فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CC و TC در افراد بیمار به ترتیب ۲۱/۸۱٪، ۳۰٪ و ۴۸/۱۸٪ مورد می‌باشد. از سوی دیگر، بیشترین فراوانی در گروه سالم متعلق به ژنوتیپ TT با ۵۴/۴۵٪ و در گروه بیمار متعلق به TC با ۴۸/۱۸٪ نمونه می‌باشد. نمودار ۱ این نتایج را نشان می‌دهد، که در بین افراد سالم ژنوتیپ TT بیشترین و ژنوتیپ TC و CC کمترین فراوانی را دارد و در بین افراد بیمار

ژنوتیپ TC بیشترین و ژنوتیپ TT کمترین فراوانی را دارد پس از بررسی فراوانی ژنوتیپ‌ها، فرکانس آلل‌ها و درصد آن‌ها بر اساس اصل هاردی-وینبرگ محاسبه گردید. نتایج این محاسبه در جدول ۲ آورده شده است. جدول ۴ نشان می‌دهد که بیشترین فراوانی متعلق به آلل T در افراد سالم است و نسبت به افراد بیمار ۲۰٪ افزایش نشان می‌دهد. آلل C نیز در افراد بیمار بیشترین فراوانی را داشته و نسبت به افراد سالم ۲۰٪ افزایش نشان می‌دهد. این مقایسه‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً افزایش آلل C عامل ایجاد دیابت در افراد است و بین آلل و ابتلا به دیابت رابطه وجود داشته باشد. از سوی دیگر فراوانی آللی و خطر ریسکی به شرح زیر است: فراوانی آللی T که الل غالب می‌باشد در گروه سالم ۶۵/۹ درصد و در گروه بیمار ۴۵/۹ درصد می‌باشد که ۲۰ درصد کاهش را نشان می‌دهد. این در حالی است که فراوانی آللی C که آلل پلی‌مورفیسم می‌باشد در گروه سالم ۳۴/۱ درصد و در گروه بیمار ۵۴/۱ می‌باشد که ۲۰ درصد در گروه بیمار افزایش نشان می‌دهد که احتمالاً بین افزایش آلل C و ریسک ابتلا به دیابت نوع دو رابطه‌ای وجود داشته باشد. شایان ذکر است که ریسک ابتلا در گروه بیمار ۲۰۲۷۸ می‌باشد و از آنجا که بیشتر از یک می‌باشد احتمال ریسک ابتلا به بیماری موجود است.

جدول ۳: نتایج آزمون کای اسکوئر برای مقایسه فراوانی دو گروه بیمار دیابتی نوع ۲ و سالم بر حسب ژنوتیپ در استان آذربایجان شرقی.

متغیر	طبقات	گروه		P
		سالم	بیمار	
ژنوتیپ	TT	۵۴/۴۵٪	۲۱/۸۱٪	۰/۰۰۰
	CC	۲۲/۷۲٪	۳۰٪	
	TC	۲۲/۷۲٪	۵۴/۴۵٪	

جدول ۴: فراوانی آلل‌های مورد مطالعه و اختلاف درصد آن‌ها به همراه ریسک ابتلا در دو گروه افراد سالم و بیمار در استان آذربایجان شرقی

نام آلل	افراد بیمار (تعداد)	افراد سالم (تعداد)	درصد اختلاف بین افراد سالم و بیمار	P	OR (CI 95%)
T	۴۵.۹	۶۵.۹	٪۲۰	۰.۰۰۰	۲.۲۸۷
C	۵۴.۱	۳۴.۱	٪۲۰	--	--
غالبیت TT	۲۴	۶۰	-	۱.۰۰۰	۱.۰۰۰
CC+CT	۸۶	۵۰	-	-	-

بررسی ۲۹۳ بیمار و ۲۶۵ فرد سالم دریافتند که ارتباط معناداری بین پلی مورفیسم rs4612666 و سگته مغزی ایسکمیک وجود دارد (۱۴). به منظور تعیین ارتباط پلی مورفیسم *NLRP3* با بیماری دیابت نوع ۲، Bai و همکاران در سال ۲۰۱۶ اظهار کردند (۱۵) دیابت نوع ۲، یک بیماری مزمن و پیچیده است. التهاب *NLRP3* نقش مهمی در مقاومت به انسولین دارد و پلی مورفیسم *NLRP3* ممکن است در ایجاد دیابت نوع ۲ نقش داشته باشد. در مطالعه آن‌ها مشاهده شد که پلی مورفیسم rs10754558 در ژن *NLRP3* در ناقلین CC خطر قابل توجهی بالاتر از ابتلا به دیابت نوع ۲ را در مقایسه با ناقلین GG هموزیگوت نشان دادند. با این حال، هیچ ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم ژنتیکی rs10754558 *NLRP3* و خطر دیابت نوع ۲ در جمعیت چینی‌ها مشاهده نشد. ممکن است علت اختلاف در نتایج دو مطالعه نشان دهنده این باشد که پلی مورفیسم rs10754558 در ژن *NLRP3* و خطر ابتلا به دیابت ارتباط معناداری نیست ولی پلی مورفیسم rs4612666 در ژن *NLRP3* و خطر ابتلا به دیابت در مطالعه حاضر ارتباط معناداری مشاهده شد. در مطالعه‌های دیگر، در سال ۲۰۱۵ توسط Wang و همکاران ۳۸۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ در چین بررسی شدند و نتایج نشان داد که از سه پلی مورفیسم مورد بررسی، فقط پلی مورفیسم rs10754558 در ژن *NLRP3* با ریسک ابتلا به دیابت نوع ۲ ارتباط دارد، اما واریانت‌های rs7512998 و rs12137901 با خطر ابتلا به این بیماری ارتباطی ندارند. پیشنهاد شد که پلی مورفیسم rs10754558 در ژن *NLRP3* به توسعه دیابت نوع دو کمک می‌کند، اما انواع rs7512998 و rs12137901 با حساسیت به این بیماری همراه نیستند که نتایج با نتایج پژوهش ما

### بحث

در پژوهش حاضر فرکانس پلی مورفیسم‌های ژن *NLRP3* در موقعیت rs4612666 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در استان آذربایجان شرقی مورد تحقیق قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین فراوانی ژنوتیپ‌ها در بین گروه افراد سالم و گروه بیمار اختلاف معنی داری وجود دارد ( $p < 0.05$ )، به طوریکه بیشترین فراوانی در گروه سالم و بیمار به ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های TT و TC می‌باشد. در تحقیقاتی که توسط محققین مختلف انجام شده، تاثیر پلی مورفیسم‌های ژن *NLRP3* در بیماری‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، در مطالعه‌ای بن حمد و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که تغییرات در ژن *NLRP3* هیچ تاثیری بر حساسیت به آرتریت روماتوئید در جمعیت تونس و فرانسه ندارد (۱۱). با این حال، ویلانی و همکاران ارتباط بین انواع توالی *NLRP3* و خطر ابتلا به بیماری کرون را شناسایی کردند (۱۲). در بررسی دیگری، نتایج مطالعه Hitomi و همکاران در سال ۲۰۰۹، ۱۵ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی تک (SNP) از *NLRP3* را بررسی کردند و نشان داد که ارتباطات قابل توجهی بین پلی مورفیسم rs4612666 انسانی در ژن *NLRP3* و حساسیت به آنافیلاکسی ناشی از غذا و آسم ناشی از آسپیرین وجود دارد (۱۳). در یک مطالعه از چین نشان داده شده که پلی مورفیسم ژنتیکی *NLRP3* ممکن است در خطر ابتلا به سگته مغزی ایسکمیک در جمعیت چینی‌ها موثر باشد (۳). در مطالعه‌ای همسو با مطالعه حاضر که ارتباط معناداری بین بروز بیماری و پلی مورفیسم ژن *NLRP3* وجود دارد، می‌توان به مطالعه Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۸ اشاره کرد که با

در سال ۲۰۱۷، بیان کردند نقشی برای التهاب  $NLRP3$  در بیماری‌های مختلفی از جمله دیابت قندی، آترواسکلروز، نفروپاتی، روماتیسم و سایر موارد گزارش شده، در نتیجه فعالیت مسیر التهابی  $NLRP3$  در بیماران مبتلا به آترواسکلروز و دیابت نوع دو در مرحله اولیه تشکیل پلاک به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۲۰). از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر کم بودن تعداد نمونه به دلیل محدود بودن مطالعه به منطقه خاص، کم بودن تعداد نمونه‌های مورد مراجعه و عدم تمایل شرکت‌کنندگان در مطالعه مانع جمع‌آوری تعداد مناسب نمونه شد، و لذا تصمیم بر این شد که ریسک ابتلا به دیابت ابتدا در بیماران مبتلا به دیابت در یک منطقه خاصی بررسی شود و در مطالعات بعدی و بدون محدودیت منطقه‌ای بتوان مطالعه را بر روی چندین استان و حتی در کل ایران ادامه داد.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر بر اساس نتایج به‌دست آمده از آنالیز ژنتیکی و آماری ارتباط معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌ها در بین گروه سالم و افراد مبتلا به دیابت مشاهده شد. با توجه به اینکه آلل C در افراد مبتلا به دیابت بیشترین فراوانی را داشته و نسبت به افراد سالم ۲۰٪ افزایش نشان می‌دهد، در نتیجه مطالعه حاضر نقش آلل C در پلی‌مورفیسم ۲۵۴۶۱۲۶۶۶ در موقعیت ژن  $NLRP3$  با افزایش احتمال ابتلا به دیابت را نشان می‌دهد.

### سپاس‌گزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد و نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب و تامین اجتماعی شهرستان بناب بابت همکاری بی‌دریغ‌شان اعلام می‌دارند.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

همه‌نگی دارد (۱۶). در برخی مطالعات اشاره شده است که شیوع دیابت نوع ۱ در بین افراد ۳۰ ساله و کمتر معمولاً بیش از ۰/۳ درصد نیست، اما دیابت نوع ۲ در این سنین شیوعی حدود ۲-۳ درصد دارد که با افزایش سن زیاد می‌شود (۱۷). در مطالعه حاضر شیوع دیابت در مردان ۳۳ درصد و در زنان ۶۷ درصد بود که تقریباً "دیابت در زنان دو برابر مردان است و از نظر میانگین سنی نیز دو جنس اختلاف چندانی نداشتند. در این مطالعه، ما دریافتیم که فراوانی الی T که ال غالب می‌باشد در گروه سالم ۶۵/۹ درصد در گروه بیمار ۴۵/۹ درصد می‌باشد که ۲۰ درصد کاهش را نشان می‌دهد. این در حالی است که فراوانی آلل C که آلل پلی‌مورفیسم می‌باشد در گروه سالم ۱/۱ درصد و در گروه بیمار ۵۴/۱ درصد می‌باشد که ۲۰ درصد در گروه بیمار افزایش نشان می‌دهد که احتمالاً بین افزایش الل C و ریسک ابتلا به دیابت نوع دو رابطه‌ای وجود داشته باشد و ریسک ابتلا در گروه بیمار ۲/۲۷۸ می‌باشد از آنجا که بیشتر از یک می‌باشد احتمال ریسک ابتلا به بیماری موجود است، ضمن اینکه ریسک ابتلا در گروه سالم ۱/۶۵۶ می‌باشد. همسو با نتایج مطالعه حاضر، Bidoki و همکاران در سال ۲۰۱۶ ارتباط بین پلی‌مورفیسم ۲۵۴۶۱۲۶۶۶ در موقعیت ژن  $NLRP3$  و توسعه دیابت نوع ۲ را گزارش کردند (۱۸). هم‌چنین در مطالعه دیگری، Hong و همکاران در سال ۲۰۱۹، بیان کردند که  $NLRP3$  (گیرنده شبیه به حوزه الیگومریزاسیون نوکلئوتیدی اتصال دهنده [NLR] خانواده پیرین حاوی دامنه ۳) التهاب عضله عضو خانواده NLR سنسورهای سلول‌های ایمنی ذاتی است. مطالعات نشان می‌دهد که مهار  $NLRP3$  از بروز سکتة مغزی ایسکمیک و دیابت جلوگیری می‌کند (۱۹). از سوی دیگر، پونتیلو و همکاران در سال ۲۰۱۰ ثابت کردند که آن پلی‌مورفیسم در ژن در ایجاد دیابت نقش دارند که این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر مشابهت دارد (۱۹). Lee و همکاران نیز

## References:

- 1-Hansen T. *Type 2 Diabetes Mellitus--A Multifactorial Disease*. Ann Univ Mariae Curie-Sklodowska Med 2002; 57(1): 544-9.
- 2-Emamgholipour S, Ebrahimi R, Bahirae A, Niazpour F, Meshkani R. *Acetylation and Insulin Resistance: A Focus on Metabolic and Mitogenic Cascades of Insulin Signaling*. Crit Rev in Clin Lab Sci 2020; 57(3): 196-214.
- 3-Zhao Y, Wieman HL, Jacobs SR, Rathmell JC. *Chapter Twenty Two Mechanisms and Methods in Glucose Metabolism and Cell Death*. Methods in Enzymology 2008; 442: 439-57.
- 4-Billings LK, Florez JC. *The Genetics of Type 2 Diabetes: What Have We Learned from GWAS?* Ann NY Acad Sci 2010; 1212: 59-77.
- 5-Arredondo A. *Diabetes: A Global Challenge with High Economic Burden for Public Health Systems and Society*. Am J Public Health 2013; 103(2): E1-E2.
- 6-Klen J, Goričar K, Janež A, Dolžan V. *NLRP3 Inflammasome Polymorphism and Macrovascular Complications in Type 2 Diabetes Patients*. J Diabetes Res 2015; 2015: 616747.
- 7-Menu P, Vince J. *The NLRP3 Inflammasome in Health and Disease: The Good, the Bad and the Ugly*. Clinical & Experimental Immunology 2011; 166(1): 1-15.
- 8-Tsetsos F, Roumeliotis A, Tsekmekidou X, Alexouda S, Roumeliotis S, Theodoridis M, et al. *Genetic Variation in CARD8, A Gene Coding for an NLRP3 Inflammasome-Associated Protein, Alters the Genetic Risk for Diabetic Nephropathy in the Context of Type 2 Diabetes Mellitus*. Diabet Vasc Dis Res 2020; 17(6): 1479164120970892.
- 9-Komada T, Muruve DA. *The Role of Inflammasomes in Kidney Disease*. Nat Rev Nephrol 2019; 15(8): 501-20.
- 10-Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, et al. *Differential Expression of NLRP3 among Hematopoietic Cells*. J Immunol 2011; 186(4): 2529-34.
- 11-Ben Hamad M, Cornélis F, Marzouk S, Chabchoub G, Bahloul Z, Rebai A, et al. *Association Study of CARD8 (P. C10X) and NLRP3 (P. Q705K) Variants with Rheumatoid Arthritis in French and Tunisian Populations*. Int J Immunogenet 2012; 39(2): 131-6.
- 12-Villani A-C, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, et al. *Common Variants in the NLRP3 Region Contribute to Crohn's Disease Susceptibility*. Nat Genet 2009; 41(1): 71-6.
- 13-Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, et al. *Associations of Functional NLRP3 Polymorphisms with Susceptibility to Food-Induced Anaphylaxis and Aspirin-Induced Asthma*. J Allergy Clin Immunol 2009; 124(4): 779-85.
- 14-Cheng L, Yin R, Yang S, Pan X, Ma A. *Rs4612666 Polymorphism of the NLRP3 Gene is Associated with the Occurrence of Large Artery Atherosclerotic Ischemic Strokes and Microembolic Signals*. Biomed Res Int 2018; 2018: 6345805.
- 15-Bai L, Cao M, Zhai Q, Wang D, Hai J, Jin S, et al. *Association of Two Common Snps on NLRP3 with Risk of Type 2 Diabetes Mellitus and their Interaction with Environmental Factors*.

International J Clinical & Experimental Medicine 2016; 9: 10499-506.

16-Wang S, Fang F, Jin W, Wang X, Zheng XS.

*Investigation into the Association Between NLRP3 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus.* Genet Mol Res 2015; 14(4): 17447-52.

17-Delli A, Lernmark Å. *Type 1 (Insulin-Dependent)*

*Diabetes Mellitus: Etiology, Pathogenesis, Prediction and Prevention.* In Jameson JL, De Groot LJ, editors. Textbook of Endocrinology, adult and children 6th ed. WB Saunders 2010; 1: 744-64.

18-Bidoki AZ, Harsini S, Sadr M, Soltani S,

Mohammadzadeh M, Najafi S, et al. *NLRP 3 Gene*

*Polymorphisms in Iranian Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis.* J Oral Pathol Med 2016; 45(2): 136-40.

19-Hong P, Gu RN, Li FX, Xiong XX, Liang WB, You

ZJ, et al. *NLRP3 Inflammasome as a Potential Treatment in Ischemic Stroke Concomitant with Diabetes.* J Neuroinflammation 2019; 16(1): 1-13.

20-Lee J, Wan J, Lee L, Peng C, Xie H, Lee C. *Study of*

*the NLRP3 Inflammasome Component Genes and Downstream Cytokines in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus with Carotid Atherosclerosis.* Lipids in Health and Disease 2017; 16(1): 1-7.

## Study of Polymorphism *Rs4612666* in *NLRP3* Gene in Patients with Type 2 Diabetes in East Azerbaijan

Fatemeh Hosseinpour Shordarag<sup>1</sup>, Hossien Soltanzade<sup>\*2</sup>, Manochehr Ghojaie<sup>2</sup>

### Original Article

**Introduction:** Type 2 diabetes is a common multifactorial disease. Studies have shown that the *NLRP3* gene plays an important role in insulin resistance. The aim of this study was to investigate the association of *rs4612666* polymorphisms of *NLRp3* gene with type 2 diabetes in the population of East Azarbaijan province.

**Methods:** In this case-control study, blood samples from 110 patients and 110 healthy individuals as control group were collected. Following to extract of DNA from all samples and the quality assay using electrophoresis, the samples with their specific primers were examined by PCR and electrophoresis. Genotyping of individuals for *rs4612666* was performed using PCR-RFLP method. Data were analyzed by SPSS software version 21 by descriptive and Chi-square test. The significance level was considered to be less than 0.05

**Results:** Analysis of the results showed a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in the frequency of TT, CC and TC genotypes related to *rs4612666* polymorphism at *NLRP3* gene position ( $P = 0.000$ ). The percentage of T allele in healthy and unhealthy individuals was 65.9% and 45.9%, respectively, and the percentage of C allele in healthy and unhealthy patients was 34.1% and 54.1%, respectively.

**Conclusion:** The results of this study suggest that there may be a link between an increase in the C allele and diabetes, although extensive studies are needed to confirm these results.

**Keywords:** polymorphism *rs4612666*, Type 2 diabetes, *NLRp3*.

**Citation:** Hosseinpour Shordarag F, Soltanzade H, Ghojaie M. Study of Polymorphism *Rs4612666* in *NLRP3* Gene in Patients with Type 2 Diabetes in East Azerbaijan. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 29(12): 4405-14.

<sup>1</sup>Master Student of Genetics, Islamic Azad University, Bonab Branch, Bonab, Iran.

<sup>2</sup>Islamic Azad University, Bonab Branch, Maragheh School of Medical Sciences, Maragheh, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 09143212679, email: Hossien4040@gmail.com