ارتباط پلی مورفیسم rs4730153 ژن ویسفاتین با ویژگی های آنترپومتریکی، سطح ویسفاتین، مقاومت به انسولین و متابولیسم لیپید در جمعیت ایرانی مبتلا به دیابت/پره دیابت

ریحانه کریمی^۱ (M.Sc)، معصومه نژادعلی^{۱*} (Ph.D)، مهدی هدایتی^۲ (Ph.D)

۱- گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون ریز، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۸

ma_nejadali@yahoo.com

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۸۷۵۴۹۳

چکیده

هدف: ویسفاتین آدیپوکین پیش التهابی می باشد که عمدتاً در چربی احشایی بیان می شود. سیتوکین ویسفاتین در چاقی و دیابت نوع ۲ افزایش می یابد. ویسفاتین یک آدیپوکین انسولین مانند است که احتمالاً در بروز واکنش های التهابی و دیابت نقش دارد. اهداف مطالعه حاضر، بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs4730153 ژن ویسفاتین با ویژگی های آنترپومتریکی، سطح ویسفاتین، مقاومت به انسولین و متابولیسم لیپید در جمعیت دیابت/پره دیابت ایرانی بود. مواد و روش ها: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۷۰ داوطلب مبتلا پره دیابت/دیابت و ۷۰ داوطلب به عنوان شاهد انجام شد. سطح سرمی ویسفاتین و انسولین با کیت الایزا و سایر پارامترها با روش های استاندارد اندازه گیری شد. تعیین ژنوتیپ با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز- چند شکلی طول قطعه محدود (PCR-RFLP) انجام شد. یافته ها: نتایج نشان داد در سطح کلسترول، انسولین، ویسفاتین، بین افراد دیابتی و غیردیابتی تفاوت معنی دار وجود ندارند ($P>0.05$). تحلیل رگرسیونی ژنوتیپ ها نشان داد که پلی مورفیسم rs 4730153 با دیابت نوع ۲ ارتباط ندارد ($P>0.05$). تفاوت معنی داری در توزیع ژنوتیپ و فراوانی آلی بین گروه های حساس به انسولین، مقاوم به انسولین و بینابینی وجود نداشت ($P>0.05$). تفاوت معنی داری در سطح کلسترول بین بیماران با ژنوتیپ های مختلف مشاهده شد ($P<0.05$). نتیجه گیری: نتایج نشان داد ارتباطی بین ویسفاتین و دیابت نوع ۲ (T2D) وجود ندارد. پلی مورفیسم rs 4730153 با دیابت و مقاومت به انسولین ارتباط معنی دار ندارد اما با متابولیسم لیپید ارتباط دارد.

واژه های کلیدی: دیابت شیرین، نیکوتین آمید فسفوریبوزیل ترانسفراز، آدیپوکین، ژنوتیپ، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

مقدمه

دیابت می شوند [۳]. قبل از این که افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ شوند؛ ابتدا در مرحله پره دیابت (پیش دیابت) قرار می گیرند، در این مرحله قند خون بالاتر از میزان طبیعی می باشد اما به اندازه ای نیست که به آن دیابت گفته شود. افرادی که در فاز پیش دیابت می باشند با اصلاح شیوه زندگی و فعالیت فیزیکی می توانند شانس ابتلا به دیابت را کاهش دهند [۴]. دیابت نوع ۲ از تعامل عوامل ژنتیکی، محیطی و سایر عوامل خطر ایجاد می شود. فقدان یا کاهش ترشح انسولین و افزایش ترشح گلوکاگون موجب تسریع پیشرفت دیابت نوع ۲ می شود. T2DM با عوارضی مانند بیماری های قلبی عروقی، نوروپاتی دیابتی، نفروپاتی و رتینوپاتی همراه است [۵].

بافت چربی علاوه بر ذخیره سازی چربی طیف وسیعی از آدیپوکین ها را ترشح می کند که در تنظیمات فیزیولوژیک ذخیره

دیابت نوع ۲ از مهم ترین اختلالات متابولیکی است [۱] که افزایش قند خون و مقاومت به انسولین از مهم ترین شاخصه های آن می باشد [۲]. امروزه جوامع مختلف با شیوع روزافزون دیابت مواجه است [۱]. شیوع جهانی دیابت در سال ۲۰۱۰ در میان بزرگسالان ۶/۴ درصد بود که این میزان به ۷/۷ درصد، معادل ۴۳۹ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ خواهد رسید. دیابت بین سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۳۰ افزایش ۶۹ درصد در کشورهای در حال توسعه و ۲۰ درصد در کشورهای توسعه یافته خواهد داشت. بر اساس مطالعات اخیر ۱۴ تا ۲۳ درصد ایرانی های بالای ۳۰ سال، دیابتی یا دچار اختلال عدم تحمل گلوکز هستند که ۲۵ درصد افراد مبتلا به عدم تحمل گلوکز، در آینده دچار

تا ۱۲۵ میلی گرم در دسی لیتر و افراد دیابتی ۱۲۶ میلی گرم در دسی لیتر و بالاتر بود [۴]. تعداد افراد بر اساس فرمول برآورد حجم نمونه، محاسبه شد. زمان مطالعه از آبان ماه ۱۳۹۶ لغایت خرداد ۱۳۹۷ بود که بر اساس تفاهم نامه هلسینکی انجام گردید. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی پزشکی تهران IR.IAU.TMU.REC.1396.270 تایید شد.

معیار ورود به این مطالعه، تابعیت ایرانی و عدم سابقه مصرف داروهای بود که برای درمان اختلالات متابولیکی استفاده می شود. معیارهای خروج از مطالعه سابقه مصرف داروی متابولیکی، مصرف الکل، مصرف مواد مخدر، بیماری حاد، حاملگی، بیماری کلیوی، بیماری های کبد، بیماری قلبی، سرطان، بیماری های ایمنی، عفونت و فشار خون بالا بود.

در اولین مرحله جهت رعایت اصول اخلاقی، اهداف مطالعه برای شرکت کنندگان توضیح داده شد و رضایت کتبی گرفته شد. سپس پرسش نامه ای شامل اطلاعات شخصی، فعالیت فیزیکی و رژیم غذایی، سوابق بیماری، داروهای خوراکی و ...، توسط هر فرد پر شد که کل پرسش نامه ها موجود است. متغیرهای قد، وزن، فشارخون با روش استاندارد اندازه گیری و نمایه توده بدنی (kg/m^2 وزن) محاسبه گردید [۱۵].

خون گیری، جداسازی سرم و DNA. ۱۰ میلی لیتر نمونه خون محیطی از افراد مورد مطالعه گرفته شد، ۵ میلی لیتر از نمونه خون در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA (به میزان ۳ میلی گرم بر میلی لیتر) و باقی مانده آن در لوله ای فاقد ضد انعقاد ریخته شد. بعد از لخته شدن خون در لوله فاقد ضد انعقاد، سرم به کمک سانتریفوژ در بیمارستان های مذکور جدا و در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتر جمع آوری شد و به پژوهشگاه غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه شهید بهشتی انتقال و در دمای ۸۰- نگهداری شد. در این مطالعه استخراج DNA از لوله های خون تام حاوی ماده ضد انعقاد با روش Salting out انجام گردید [۱۹] و در دمای ۲۰- نگهداری شد.

بررسی پارامترهای بیوشیمیایی. سطح گلوکز با کیت تشخیصی گلوکز شرکت پارس آزمون با روش فتومتریک اندازه گیری شد. سطح کلسترول (CHOL)، تری گلیسیرید (TG) به روش رنگ سنجی آنزیمی اندازه گیری شد. سطح سرمی ویسفاتین و غلظت انسولین با روش ELISA اندازه گیری شد. کیت استفاده شده برای ارزیابی انسولین از شرکت مرکودیا سوئد و کیت ویسفاتین از Zellbio آلمان تهیه شد. مقاومت به انسولین بر اساس فرمول $\text{HOMA-IR} = \text{گلوکز ناشتا} \times \text{انسولین ناشتا}$ (mmol/lit) / ۲۲/۵ محاسبه گردید [۱۵].

چربی، متابولیسم و رفتار تغذیه ای و همچنین در اختلالات مرتبط به چاقی از جمله دیابت نقش دارند [۱]. ویسفاتین یکی از آدیپوکین ها می باشد که در سال ۲۰۰۵ شناسایی شد [۶]، این پروتئین عمدتاً از بافت چربی احشایی ترشح می شود و نقش مهمی در ترشح انسولین از سلول های β پانکراس دارد. ویسفاتین به گیرنده انسولین در جایگاهی متفاوت از انسولین باند می شود و عملکرد شبه انسولینی دارد [۷] مطالعات نشان داده است ویسفاتین نقش مهمی در روند التهابی دیابت نوع ۲ دارد [۸، ۹]. ویسفاتین تولید سیتوکین های التهابی را با مهار سیگنالینگ انسولین القا می کند. مطالعات متعددی افزایش سطح ویسفاتین پلاسما را در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ و مقاومت به انسولین نشان داده است [۸، ۱۰، ۱۱]. ویسفاتین نقش آنزیمی در بیوسنتز نیکوتین آمید آدنین دی نکلوتید دارد [۱۲]، از این رو ترشح انسولین از سلول های بتا را با تولید نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD) تنظیم می کند [۱۳]. ویسفاتین به گیرنده انسولین متصل شده و با کاهش آزادسازی گلوکز از سلول های کبد و تحریک استفاده از گلوکز در سلول های چربی و عضلانی، موجب کاهش قند خون می شود [۱۴].

ژن ویسفاتین روی بازوی بزرگ کروموزوم ۷ قرار دارد [۱۵]، شامل ۱۰ اینترون و ۱۱ اگزون است [۱۶] که پلی پپتیدی شامل ۴۹۱ آمینواسید با وزن مولکولی ۵۲ کیلودالتون را می سازد [۱۵]. ویسفاتین موجب اختلال در سیگنالینگ انسولین می شوند، به این دلیل ژن هایی که میزان این سیتوکین ها را تنظیم می کنند با مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و چاقی ارتباط دارند [۸]. ارتباط برخی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در ژن ویسفاتین با پارامترهای مربوط به دیابت نوع ۲ و بیماری های پلی ژنیک مانند چاقی تأیید شده است [۱۶]. پلی مورفیسم rs4730153 در اینترون ژن ویسفاتین قرار دارد. بسیاری از مطالعات ارتباط پلی مورفیسم rs4730153 را با متابولیسم گلوکز، لیپید [۱۷] و پروفایل متابولیکی نشان داده است [۱۸]. با توجه به اهمیت موضوع، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر پلی مورفیسم rs4730153 بر ویژگی های آنترپومتریک، سطح ویسفاتین، مقاومت انسولین و متابولیسم لیپید در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو انجام شده است.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر به صورت مورد شاهده ای است و نمونه های مورد بررسی از بین مراجعه کنندگان به بیمارستان های بوعلی و پارس انتخاب شدند. ۱۴۰ نفر از افراد مراجعه کننده در این طرح وارد شدند که شامل ۷۰ فرد مبتلا به پره دیابت / دیابت نوع دو و ۷۰ فرد سالم بود. قند خون ناشتا افراد مبتلا به پره دیابت ۱۰۰

باند های ژل پلی آکریل آمید با استفاده از نیترا ت نقره ۱/۰ درصد رنگ آمیزی شد. برای رنگ آمیزی ابتدا جهت ثابت کردن DNA، ژل را به مدت ۶ تا ۱۰ دقیقه در محلول اسید الکل قرار داده، سپس جهت رنگ آمیزی ژل از نیترا ت نقره ۱ درصد و در پایان از محلول ظهور کننده باندها شامل سدیم هیدروکسید و فرمالدئید استفاده شد.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد برای آنالیز داده های آماری از آزمون های توصیفی و استنباطی شامل آزمون کلموگروف-اسمیرنوف برای بررسی نرمال بودن داده ها و آزمون من ویتنی و آزمون تی مستقل جهت مقایسه متغیرها در دو گروه بیمار و در سه گروه ژنوتیپ و آزمون کای اسکور و یا فیشر برای متغیرهای کیفی استفاده شد. بررسی ارتباط بین خطر ابتلا به بیماری دیابت و پلی مورفیسم rs 4730153 با رگرسیون لجستیک انجام شد. سطح معنی داری کم تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم rs 4730153 در ژن ویسفاتین در شکل ۱ آمده است. طول باندها در این پلی مورفیسم ۱۵۷bp، ۹۰bp، ۶۷bp می باشد. قطعات ۹۰bp و ۶۷bp جفت باز معرف آلل G و قطعه ۱۵۷bp معرف آلل A است. ژنوتیپ AA با یک باند با طول ۱۵۷bp نمایش داده شد (ستون ۶). ژنوتیپ GG با دو باند و با طول های ۹۰bp و ۶۷bp (ستون ۱ تا ۵ و ۷) و ژنوتیپ AG با سه باند و با طول های ۱۵۷ و ۹۰bp و ۶۷bp مشخص گردید (ستون ۸، ۹).

بررسی مشخصات بیوشیمیایی و دموگرافیک در دو گروه نشان می دهد که میانگین سنی افراد شرکت کننده در گروه بیمار $53/13 \pm 0/5$ سال و در گروه کنترل $37/0 \pm 11/7$ سال بود ($P < 0/001$). بررسی افراد شرکت کننده از نظر جنس نشان داد در گروه بیمار (۵۴/۳ درصد) ۳۸ زن و گروه کنترل (۷۰ درصد) ۴۹ زن وجود دارد، اختلاف بین دو گروه معنی دار نبود ($P > 0/05$). مقایسه افراد دو گروه از نظر شاخص توده بدنی، دور کمر، دور باسن قند ناشتا، تری گلیسرید و HOMA اختلاف معنی داری را در بین دو گروه نشان داد (جدول ۱). از آزمون من ویتنی و آزمون تی مستقل جهت مقایسه متغیرها در دو گروه بیمار و شاهد استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ: برای تعیین ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs4730153 ژن ویسفاتین، از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز-چندشکلی طول قطعه محدود (PCR-RFLP) استفاده شد. تکثیر قطعات حامل پلی مورفیسم rs 4730153 با استفاده از روش PCR انجام شد و یک توالی ۱۵۷ جفت بازی از اینترون شماره ۲ مربوط به ژن ویسفاتین در دستگاه Thermal cycler تکثیر گردید. پرایمر استفاده شده در این مطالعه توسط نرم افزار Gene runner و اولیگو بررسی شد و از شرکت پیشگام تهیه گردید توالی پرایمرهای استفاده شده عبارتند از: Forward primer 5'-GGTATGGTTGACCCAGCTAC-3' و Reverse primer 5'-CAGATTTACTTAGGCAGACACTTGA-3' جهت انجام واکنش PCR برای قطعه حامل پلی مورفیسم rs 4730153، مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با مقادیر ۱۲/۵ میکرولیتر mix Master، یک میکرولیتر DNA، یک میکرولیتر از هر پرایمر و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه گردید و پس از مخلوط شدن مواد، به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد. برنامه استفاده شده برای تکثیر قطعه حامل پلی مورفیسم rs4730153 به دستگاه PCR داده شد. برنامه دستگاه شامل مرحله واسرشت ابتدایی در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل و برای هر سیکل مرحله واسرشت به مدت ۳۵ ثانیه در ۹۶ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال به مدت ۳۵ ثانیه، در ۶۰ درجه سانتی گراد و مرحله طویل سازی ۳۵ ثانیه، در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله گسترش نهایی، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۷۲ سانتی گراد انجام شد. صحت تکثیر قطعات مورد نظر بر روی ژل آکریل آمید بررسی شد. برای تعیین ژنوتیپ به محصول PCR که شامل قطعات حامل پلی مورفیسم rs4730153 بود آنزیم محدود کننده RsaI (TspRI) شرکت فرمنتاز اضافه گردید. در این مرحله مطابق با پروتکل (۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر آنزیم و ۲ میکرولیتر بافر) محصول PCR همراه با آنزیم به مدت ۱۶ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از گذشت ۱۶ ساعت، ۵ میکرولیتر از محصول RFLP بر روی ژل آکریل لود می گردد.

الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل: الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید با ولتاژ ۱۸۰ ولت و به مدت ۲/۵ ساعت انجام شد. برای تهیه ژل ۱۲ درصد، محلولی از ۱۲ میلی لیتر آکریل آمید ۳۰ درصد، ۱۲ میلی لیتر آب مقطر، ۷ میلی لیتر محلول بافری تریس بورات (Tris-Borate-EDTA) و ۳۵۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات و ۳۵ میکرولیتر تترا متیل اتیلن دی آمین (Temed) آماده شد و بین شیشه های الکتروفورز (ژل عمودی) ریخته شد [۲۰]. سپس ۵ میکرولیتر از محصول RFLP هر نمونه در چاهک ها لود شد. پس از انجام الکتروفورز،

ژنوتیپ‌های AA,GG,AG تفاوت نشان داد اما معنی‌دار نیست. در سایر متغیرها تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. در گروه کنترل در هیچ‌یک از متغیرها تفاوت معنی‌دار یافت نشد (جدول ۲).

اگر مقدار HOMA افراد شرکت‌کننده کم‌تر از ۲/۲۴ باشد اشخاص حساس به انسولین، اگر مابین ۲/۲۴ و ۳/۵۹ باشد مقاوم به انسولین بینابینی و اگر بیش‌تر از ۳/۵۹ باشد مقاوم به انسولین می‌باشند [۲۱]. فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در جدول ۳ برای افراد حساس به انسولین، مقاوم به انسولین بینابینی و مقاوم به انسولین آمده است. نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ rs4730153 با مقاومت به انسولین ارتباط ندارند (جدول ۳).

تحلیل رگرسیونی برای ژنوتایپ‌ها در گروه سالم و بیمار انجام شد که نتایج در جدول ۴ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs4730153 در بروز بیماری دیابت نقش ندارند.

شکل ۱: نتیجه هضم آنزیمی قطعه حامل پلی مورفیسم rs4730153. طول باندها ۹۰ bp، ۹۷ bp، ۱۵۷ bp است، تک باند ۱۵۷ bp نشانگر ژنوتیپ AA، دو باند ۹۰ bp و ۹۷ bp نشانگر ژنوتیپ GG و سه باند ۹۰ bp و ۹۷ bp و ۱۵۷ bp نشانگر ژنوتیپ AG است.

بررسی عوامل بیوشیمیایی به تفکیک ژنوتیپ‌ها در سه گروه ژنوتیپ در افراد سالم و بیمار با استفاده از آزمون من‌ویتنی و آزمون تی مستقل انجام شد. نتایج نشان داد که بین بیماران حامل ژنوتیپ‌های مختلف از لحاظ سن و کلسترول تفاوت معنی‌دار وجود دارد، سطح تری‌گلیسرید نیز در حاملین

جدول ۱. مقایسه میانگین‌ها در افراد دیابتی و سالم

متغیرها	دیابتی (n=۷۰)	سالم (n=۷۰)	P-value
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	۲۸/۱±۶/۳	۲۵/۲±۴/۸	۰/۰۰۴
دور کمر (سانتی متر)	۹۶/۲±۱۳/۲	۱۰۳/۱±۱۳/۸	۰/۰۱۲
دور باسن (سانتی متر)	۱۰۵/۵±۱۵/۳	۹۶/۶±۱۶/۳	۰/۰۰۶
قند ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۶۸/۳±۶۲/۵	۸۸/۲±۸/۵	<۰/۰۰۱
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۸۹/۵±۴۹/۲	۱۶۹/۳±۴۰/۵	۰/۰۵۵
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۳۸ (۹۸/۷-۲۰۲)	۹۵/۵ (۸۳/۲-۱۶۱/۲)	۰/۰۱۲
انسولین (میلی یونیت بر لیتر)	۹/۵ (۶/۱-۱۵/۳)	۸/۴ (۵/۵-۱۳/۹)	۰/۳۱۹
ویسفاتین (نانوگرم بر میلی لیتر)	۲۰/۹±۱۲/۰	۲۲/۴±۱۱/۸	۰/۴۶۴
HOMA	۳/۳ (۲/۵-۵/۹)	۱/۷ (۱/۳-۳/۰)	<۰/۰۰۱

جدول ۲. توزیع فراوانی افراد بیمار بررسی در هر ژنوتیپ RS4730153 در گروه بیمار و شاهد

متغیر کمی	AA	GG	AG	P-value
سن	۳۷/۳±۱۳/۰	۳۶/۸±۱۵/۸	۳۶/۹±۱۱/۰	۰/۹۹۷
(سال)	۴۶/۹±۱۱/۷	۶۴/۹±۸/۴	۵۱/۵±۱۴/۶	۰/۰۰۶
نمایه توده بدنی	۲۶/۱±۶/۲	۲۳/۵±۳/۷	۲۵/۸±۴/۷	۰/۱۷۵
(کیلوگرم بر مترمربع)	۲۶/۰±۵/۴	۳۰/۲±۱۰/۳	۲۷/۷±۵/۴	۰/۳۲۶
دور کمر	۹۸/۷±۱۲/۴	۱۰۲/۰±۱۲/۹	۱۰۴/۴±۱۴/۵	۰/۶۱۰
(سانتی متر)	۸۹/۶±۱۳/۱	۹۴/۳±۴/۳	۹۷/۳±۱۴/۸	۰/۲۵۹
دور باسن	۹۸±۱۵/۶	۹۶/۰±۱۳/۳	۹۶/۵±۱۷/۶	۰/۹۷۱
(سانتی متر)	۱۰۳/۸±۲۰/۷	۹۸/۸±۷/۲	۱۰۷/۰±۱۵/۳	۰/۳۷۳
قند ناشتا	۸۷/۶±۹/۶	۸۹/۱±۸/۰	۸۷/۹±۸/۷	۰/۸۵۷
(میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۶۵/۷±۶۰/۹	۱۴۸/۲±۴۶/۹	۱۷۸/۹±۷۲/۳	۰/۳۳۰
کلسترول	۱۹۳/۰±۱۸/۳	۱۶۲/۴±۳۴/۳	۱۶۷/۰±۴۴/۸	۰/۴۵۵
(میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۵۴/۲±۳۷/۱	۱۶۶/۷±۳۷/۷	۲۰۸/۴±۵۰/۰	۰/۰۰۴
تری گلیسرید	۹۵ (۸۷-۱۶۲/۲)	۹۳ (۸۶-۱۵۸)	۹۷ (۸۱/۵-۱۶۴)	۰/۹۹۰
(میلی گرم بر دسی لیتر)	۹۸/۵ (۷۶-۱۴۸)	۱۲۲/۵ (۱۰۱-۱۸۳)	۱۵۰/۵ (۱۰۹-۲۴۷)	۰/۰۷
انسولین	۱۰/۴ (۷/۲-۱۸/۲)	۹/۵ (۶/۳-۱۶/۰)	۷/۵ (۵/۴-۱۱/۷)	۰/۱۳۸
(میلی یونیت بر لیتر)	۱۱/۳-۵/۲ (۸/۵)	۱۵/۱-۴/۹ (۱۱)	۱۶/۲-۶/۲ (۸/۷)	۰/۶۳۹

متغیر کمی	AA	GG	AG	P-value
ویسفاتین	۲۴/۸±۱۱/۰	۱۹/۰±۱۳/۴	۲۳/۴±۱۱/۰	۰/۳۲۵
(نانوگرم بر میلی لیتر)	۱۸/۸±۱۰/۳	۲۰/۰±۱۳/۲	۲۰/۰±۱۲/۴	۰/۹۵۹
HOMA	۲/۴ (۱/۵-۴/۳)	۲/۳ (۱/۴-۳/۴)	۱/۵ (۱/۱-۲/۴)	۰/۱۳۲
بیمار	۳/۲ (۲/۰-۵/۳)	۴/۱ (۱/۶-۷)	۳/۲ (۲/۵-۶/۰)	۰/۶۳۱

جدول ۳. توزیع فراوانی ژنوتایپ‌ها در گروه‌بندی HOMA

ژنوتایپ rs4730153	حساس به انسولین	مقاوم به انسولین بینابینی	مقاوم به انسولین
AA	۹ (۱۴/۳)	۶ (۲۱/۴)	۷ (۱۷/۹)
GG	۱۵ (۲۳/۸)	۶ (۲۱/۴)	۱۱ (۲۸/۲)
AG	۳۹ (۶۱/۹)	۱۶ (۵۷/۱)	۲۱ (۵۳/۹)
الل rs4730153			
A	۵۷ (۴۵/۲)	۲۸ (۵۰/۰)	۳۵ (۴۴/۹)
G	۶۹ (۵۴/۸)	۲۸ (۵۰/۰)	۴۳ (۵۵/۱)

جدول ۴. تحلیل رگرسیونی ژنوتایپ‌ها

ژنوتایپ rs4730153	بیمار	سالم	P-value	OR (95% CI)
AA	۱۳ (۲۱/۳)	۹ (۱۲/۹)	۰/۳۱۱	۱/۶ (۰/۶۳-۴/۱۷)
GG	۱۴ (۲۳/۰)	۱۹ (۲۷/۱)	۰/۵۴۶	۰/۷۸ (۰/۳۵-۱/۷۳)
AG	۳۴ (۵۵/۷)	۴۲ (۶۰/۰)	۰/۸۲۱	۰/۹۲ (۰/۴۶-۱/۸۵)
A	۶۱ (۴۹/۲)	۶۰ (۴۲/۹)	۰/۳۶۸	۱/۲۵ (۰/۷۷-۲/۰۳)

بحث و نتیجه‌گیری

ویسفاتین آدیپوکین جدیدی است که توسط بافت چربی تولید می‌شود. این پروتئین سنتز چربی را تسهیل می‌کند و عملکرد شبه انسولینی دارد. مطالعات نشان می‌دهد که ویسفاتین ممکن است مارکری برای وضعیت التهابی [۲۲]، دیابت [۹] و مقاومت به انسولین [۸، ۲۲] باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تفاوت معنی‌دار در میانگین سطح انسولین و ویسفاتین در دو گروه دیابتی و غیردیابتی وجود ندارد اما سایر متغیرها اختلاف معنی‌دار نشان داد. هم‌چنین تفاوتی در سطح انسولین، شاخص HOMA و سطح ویسفاتین در حاملین ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم rs4730153 یافت نشد. توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها در گروه‌بندی HOMA نشان داد که ژنوتیپ rs4730153 با مقاومت به انسولین ارتباط ندارد ($P > 0.05$). تحلیل رگرسیونی ژنوتیپ‌ها با دیابت نشان داد که ژنوتیپ rs4730153 در بروز بیماری دیابت نقش ندارند. در تحقیق حاضر سطح کلسترول در بیماران حامل ژنوتیپ AA، AC، AG تفاوت معنی‌دار و سطح تری‌گلیسرید تفاوت حاشیه‌ای نشان داد.

برخلاف نتایج حاضر در بسیاری از مطالعات افزایش سطح ویسفاتین در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ [۲۳] و دیابت بارداری [۲۴] نسبت به افراد سالم دیده شد. لوپز و همکاران نیز افزایش سطح ویسفاتین را در بیماران دیابتی مشاهده کردند که

مدت طولانی از ابتلای آن‌ها گذشته بود [۲۵]. اما یاتارو و همکاران کاهش سطح ویسفاتین را در بیماران دیابتی گزارش کردند [۲۶]. در مطالعه Mujgan Gurler که روی سه گروه افراد پرده‌دیابتی و دیابتی و سالم انجام شد سطح ویسفاتین در گروه دیابتی و پرده‌دیابتی نسبت به گروه کنترل بیش‌تر بود [۲۷]، Baltaci تفاوت معنی‌دار در سطح ویسفاتین در افراد پرده‌دیابت نسبت به گروه کنترل گزارش کرد [۲۸]. در بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs4730153 با مقاومت به انسولین توسط Vasilache و همکاران مشابه نتایج ما ارتباطی بین پلی مورفیسم rs4730153 با پارامترهای آنترپومتریک، شاخص HOMA و سطح ویسفاتین مشاهده نشد [۱۸]. اما تحقیقات Larrad و همکاران بر روی افراد بزرگسال، ارتباط معنی‌دار بین پلی مورفیسم rs4730153 با گلوکز، انسولین و شاخص HOMA نشان داد [۱۸]، نتایج متفاوت و متناقض تحقیقات ممکن است به دلیل ناهمگونی قومی، ویژگی‌های جمعیتی مختلف (کودکان، مردان و زنان) و جنسیت [۲۳]، تفاوت در نژاد، تعداد افرادی مورد بررسی و تکنیک‌های استفاده شده (کیت الایزا ویسفاتین) باشد [۲۹]. نتایج بررسی Bottcher و همکاران بر روی اثرات ژنوتیپ‌های rs4730153 در بروز بیماری دیابت و سطح ویسفاتین نشان داد فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs4730153 بین دو گروه افراد مبتلا به دیابت و سالم تفاوت

همسان نبودن‌های مورد بررسی از نظر سن و جنس و شاخص توده بدنی بود. پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی بر روی نمونه‌ها بیش‌تر با تفکیک دیابت و پره‌دیابت انجام شود.

ارتباط پلی‌مورفیسم‌ها با یک بیماری خاص ممکن است در جمعیت‌های مختلف به دلیل زمینه ژنتیکی و محیطی، متفاوت ظاهر کند، از این‌رو نتایج مشابه یا متفاوت قابل انتظار است. در مطالعه حاضر، سطح ویسفاتین در بین افراد سالم و دیابتی تفاوت معنی‌داری نداشت. بین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs4730153 با دیابت و مقاومت به انسولین ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد اما با توجه به نتایج پلی‌مورفیسم rs 4730153 با متابولیسم لیپید ارتباط دارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از خانم دکتر لاله قانع، خانم دکتر ساعتیان در بیمارستان بوعلی تهران و خانم آذر دلبرپور و دوستان عزیزی که در پژوهشگاه غدد شهید بهشتی ما را یاری رساندند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

منابع

- [1] Zarei M, Beheshti Nasr SM, Hamedinia M, Taheri Chadorneshin H, Askari Majdabadi H. Effects of 12 weeks of combined aerobic-resistance exercise training on levels of chemerin, omentin and insulin resistance in men with type 2 diabetes. *Koomesh* 2020; 22: 155-163. (Persian). <https://doi.org/10.29252/koomesh.22.1.155>
- [2] Telikani Z, Sheikh V, Borzouei S, Salehi I, Amirzargar MA, Alahgholi-Hajibehzad M. Effect of sitagliptin on serum levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Koomesh* 2020; 22: 71-77. (Persian).
- [3] Hamed T, Mostafa P. Prevalence and Severity of Neuropathy in Patients with Type II Diabetes in Zahedan, Iran. *Prevalence* 2020; 8: 2423-5571.
- [4] Pooladi S, Sadeghi S, Vahedprast H, Bagherzadeh R, Sharifi S. Effect of the training based on islamic lifestyle model on fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin in people with prediabetes. *J Diabet Nurs* 2019; 7: 683-693.
- [5] Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci* 2014; 11: 1185. <https://doi.org/10.7150/ijms.10001> PMID:25249787 PMCID:PMC4166864
- [6] Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307: 426-430. <https://doi.org/10.1126/science.1097243> PMID:15604363
- [7] Taşdemir E, Şermet A. The relationship between plasma adiponectin, adiponectin, vaspin, visfatin, and leptin levels with glucose metabolism and diabetes parameters. *Diabetes* 2019; 15: 21. <https://doi.org/10.14744/hnhj.2019.62534>
- [8] Hetta HF, Ez-Eldeen ME, Mohamed GA, Gaber MA, Gaber HM, Ahmed EA, et al. Visfatin serum levels in obese type 2 diabetic patients: relation to proinflammatory cytokines and insulin resistance. *Egypt J Immunol* 2018; 25: 141-151.
- [9] Yin C, Hu W, Wang M, Xiao Y. The role of the adipocytokines vaspin and visfatin in vascular endothelial function and insulin resistance in obese children. *BMC Endoc Disord* 2019; 19: 127. <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0452-6> PMID:31771561 PMCID:PMC6878710

معنی‌دار ندارد، هم‌چنین در این پژوهش ارتباطی بین پلی‌مورفیسم rs4730153 با متابولیسم گلوکز و هم‌چنین بیان ژن و سطح ویسفاتین یافت نشد [۳۰]. Johansson و همکاران نیز ارتباطی بین پلی‌مورفیسم rs4730153 با ویسفاتین، BMI، انسولین، گلوکز، و TG گزارش نکردند [۳۱]. Körner و همکاران هم مشابه یافته‌های ما در پژوهشی که بر روی ۸۹۸ نفر انجام دادند، ارتباطی بین پلی‌مورفیسم rs4730153 و متابولیسم گلوکز (گلیسمی ناشتا، خوراکی) مشاهده نکردند [۳۲]. Vasilache و همکاران مشابه تحقیق حاضر تفاوت معنی‌دار در سطح کلسترول در بیماران حامل ژنوتیپ AA.AC,AG مشاهده کردند [۱۸].

فراوانی آلل A در مطالعه حاضر که بر روی افراد بزرگسال انجام شد در گروه بیمار ۴۸/۴ درصد و در افراد سال ۴۲/۹ درصد بود و در جمعیت اسکاندیناوی سفید پوست آلمانی‌ها و سوئدی به ترتیب ۴۸ درصد و ۴۱/۶ درصد و در کودکان هان چین تقریباً ۸ درصد بود علت تفاوت در فراوانی آلل A می‌تواند جمعیت‌های مختلف مورد بررسی، سن و تکنیک‌های استفاده شده باشد. در کودکان چاق چینی پلی‌مورفیسم rs4730153 اثر قابل توجهی بر TG داشت آنان گزارش کردند پلی‌مورفیسم rs4730153 با متابولیسم لیپید ارتباط دارد که این نتایج مشابه یافته‌های پژوهش حاضر است [۱۷]. در حالی‌که Körner و Johansson بر خلاف مطالعه ما هیچ ارتباطی بین پلی‌مورفیسم RS4730153 با لیپید مشاهده نکردند [۳۲، ۳۳]. Lia و همکاران ارتباط پلی‌مورفیسم rs4730153 را با چاقی و اختلالات گلوکز و سوخت و ساز چربی گزارش کردند و نشان دادند ژنوتیپ هموزیگوت GG بر متابولیسم گلوکز و لیپید در کودکان و نوجوانان چاق چینی موثر بوده و موجب کاهش سطح تری‌گلیسرید می‌شود [۱۷]. بسیاری از تحقیقات نشان داد ویسفاتین بر متابولیسم گلوکز / لیپیدها موثر است اما هنوز هم این مساله مورد اختلاف است [۳۲].

در بسیاری از جمعیت‌ها ویسفاتین به عنوان مارکری برای دیابت معرفی شده است [۸]. اما در مطالعه حاضر ارتباطی بین ویسفاتین و دیابت مشاهده نشد، هم‌چنین ارتباطی بین پلی‌مورفیسم rs4730153 با دیابت و مقاومت به انسولین یافت نشد. پلی‌مورفیسم rs4730153 ارتباط معنی‌دار با سطح کلسترول در جمعیت ما نشان داد. با توجه به نتایج متناقض مطالعات بیش‌تری لازم است تا دقیق‌تر و به طور خاص نقش پاتوفیزیولوژیک ویسفاتین تعیین شود و پلی‌مورفیسم‌های مسئول این اثرات ژنتیکی به طور کامل مشخص گردد [۲۲].

از محدودیت‌های این مطالعه، حجم کم نمونه بود که علت آن تعداد کم افراد بدون سابقه مصرف داروی متابولیکی هم‌چنین

<https://doi.org/10.1016/j.mgene.2015.08.004>

PMid:30941280 PMCID:PMC5963396

[23] Ashoori M, Nezhadali M, Shiehorteza M. The relationship between visfatin levels and Anthropometric parameters, and insulin resistance in women with prediabetes and type 2 diabetes. *Yafteh* 2018; 20: 9-18. (Persian).

[24] Radzicka S, Pietryga M, Iciek R, Brazert J. The role of visfatin in pathogenesis of gestational diabetes (GDM). *Ginekologia Polska* 2018; 89: 518-521.

<https://doi.org/10.5603/GP.a2018.0088>

PMid:30318580

[25] López-Bermejo A, Chico-Julià B, Fernández-Balsells M, Recasens M, Esteve E, Casamitjana R, et al. Serum visfatin increases with progressive β -cell deterioration. *Diabetes* 2006; 55: 2871-2875.

<https://doi.org/10.2337/db06-0259>

PMid:17003355

[26] Yaturu S, Davis J, Franklin L, Shi R, Venkatesh P, Jain SK. Visfatin levels are low in subjects with type 2 diabetes compared to age-matched controls. 2012.

<https://doi.org/10.4236/jdm.2012.24058>

[27] Mujgan Gurler A, Koc D, Ozdemir A, Ekizoglu I, Altay M, Degirmencioglu S. Serum visfatin levels in patients with subclinical and newly diagnosed type2 diabetes mellitus. *Acta Med Mediterr* 2017; 33: 197-201.

[28] Baltacı D, Tuncel MC, Cetinkaya M, Gunduz MT, Ozbey Z, Admis O, et al. Evaluation of visfatin in patients with obesity, metabolic syndrome, insulin resistance and impaired glucose tolerance; case-control study. *Evaluation* 2016; 4: 61-67.

<https://doi.org/10.5505/actamedica.2016.00710>

[29] Martínez Larrad MT, Corbatón Anchuelo A, Fernández Pérez C, Pérez Barba M, Lazcano Redondo Y, Serrano Ríos M. Obesity and cardiovascular risk: Variations in visfatin gene can modify the obesity associated cardiovascular risk. Results from the Segovia population based-study. Spain. *PloS One* 2016; 11: e0153976.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153976>

PMid:27166797 PMCID:PMC4864316

[30] Böttcher Y, Teupser D, Enigk B, Berndt J, Klötting N, Schön MR, et al. Genetic variation in the visfatin gene (PBEF1) and its relation to glucose metabolism and fat-depot-specific messenger ribonucleic acid expression in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2725-2731.

<https://doi.org/10.1210/jc.2006-0149>

PMid:16636125

[31] Johansson LM, Johansson LE, Ridderstråle M. The visfatin (PBEF1) G-948T gene polymorphism is associated with increased high-density lipoprotein cholesterol in obese subjects. *Metabolism* 2008; 57: 1558-1562.

<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.06.011>

PMid:18940394

[32] Körner A, Böttcher Y, Enigk B, Kiess W, Stumvoll M, Kovacs P. Effects of genetic variation in the visfatin gene (PBEF1) on obesity, glucose metabolism, and blood pressure in children. *Metabolism* 2007; 56: 772-777.

<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.01.009>

PMid:17512309

[33] Ferrari GD, Rodrigues JA, Fernandes IA, Júnior CR. Association between rs4730153 Gene SNP and fasting glucose, triglyceride, HDL and body mass index levels in overweight Brazilian adults. *Int J Cardiovasc Sci* 2016; 29: 471-476.

<https://doi.org/10.5935/2359-4802.20160067>

[10] AL-Shammaree SA. Plasma visfatin levels and insulin sensitivity or resistance relationship in type 2 diabetes. *J Contem Med Sci* 2017; 3.

<https://doi.org/10.22317/jcms.12201708>

[11] Heo YJ, Choi SE, Jeon JY, Han SJ, Kim DJ, Kang Y, et al. Visfatin Induces Inflammation and Insulin Resistance via the NF- κ B and STAT3 Signaling Pathways in Hepatocytes. *J Diabetes Res* 2019; 2019: 4021623.

<https://doi.org/10.1155/2019/4021623>

PMid:31396538 PMCID:PMC6664505

[12] Zheng LY, Xu X, Wan RH, Xia S, Lu J, Huang Q. Association between serum visfatin levels and atherosclerotic plaque in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 2019; 11: 60.

<https://doi.org/10.1186/s13098-019-0455-5>

PMid:31367237 PMCID:PMC6657107

[13] Sayers SR, Bevil RL, Fine NH, Fine NH, Huang GC, Choudhary P, et al. Structure-functional changes in eNAMPT at high concentrations mediate mouse and human beta cell dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2020; 63: 313-323.

<https://doi.org/10.1007/s00125-019-05029-y>

PMid:31732790 PMCID:PMC6946736

[14] Kamińska A, Kopczyńska E, Bronisz A, Zmudzińska M, Bieliński M, Borkowska A, et al. An evaluation of visfatin levels in obese subjects. *Endokrynol Pol* 2010; 61: 169-173.

[15] Abdel-Hassib M, Hassabo AA, Elashmawy H, Mansour MI. Serum visfatin level in prediabetics and its relation to left ventricular function. *Egy J Int Med* 2019; 31: 703.

[16] Saddi-Rosa P, Oliveira CS, Giuffrida FM, Reis AF. Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. *Diabet Metab Syndrome* 2010; 2: 21.

<https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-21>

PMid:20346149 PMCID:PMC2857825

[17] Lai A, Chen W, Helm K. Effects of visfatin gene polymorphism RS4730153 on exercise-induced weight loss of obese children and adolescents of Han Chinese. *Int J Biol Sci* 2013; 9: 16.

<https://doi.org/10.7150/ijbs.4918>

PMid:23289013 PMCID:PMC3535530

[18] Vasilache SL, Mărginean CO, Boaghi A, Pop RM, Banescu C, Moldovan VG, et al. Implications of visfatin genetic variants in the metabolic profile of the Romanian pediatric population. *Revist Roman Med Lab* 2020; 28: 163-174.

<https://doi.org/10.2478/rrlm-2020-0015>

[19] Schäffler A, Büchler C, Müller-Ladner U, Herfarth H, Ehling A, Paul G, et al. Identification of variables influencing resistin serum levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 2004; 36: 702-707.

<https://doi.org/10.1055/s-2004-826015>

PMid:15523596

[20] Hedayati M, Salehi Jahromi M, Zarif Yeganeh M, Daneshpour M, Hoghooghi Rad L, Azizi F. Association between serum level of anti-TPO titer and polymorphisms G1193/C Exon 8 and C2145/T Exon 12 of thyroid peroxidase gene in an Iranian population.

[21] Bahar A, Kashi Z, Sohrab M, Kosaryan M, Janbabai G. Relationship between beta-globin gene carrier state and insulin resistance. *J Diabet Metab Disord* 2012; 11: 22.

<https://doi.org/10.1186/2251-6581-11-22>

PMid:23497547 PMCID:PMC3598161

[22] Rong J, Chu M, Xing B, Zhu L, Wang S, Tao T, et al. Variations in the PBEF1 gene are associated with body mass index: A population-based study in northern China. *Meta Gene* 2015; 6: 65-68.

Association of visfatin gene polymorphism rs4730153 with anthropometric characteristics, visfatin level, insulin resistance and lipid metabolism in Iranian diabetic/pre-diabetic population

Reyhaneh karimi (M.Sc)¹, Masoumeh Nezhadali (Ph.D)^{*1}, Mehdi Hedayati (Ph.D)²

1 – Dept. of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran

2 - Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Science, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 9123875493 ma_nejadali@yahoo.com

Received: 3 Sep 2020 ; Accepted: 28 Apr 2021

Introduction: Visfatin is a pro-inflammatory adipokine that is abundantly expressed in visceral adipose tissue. The cytokine visfatin is increased in obesity and type 2 diabetes. Visfatin is an insulin-mimetic adipokine that may also play a role in the development of diabetes and inflammatory reactions. The aims of the present study were to investigate the association of visfatin gene polymorphism rs4730153 with anthropometric characteristics, visfatin level, insulin resistance and lipid metabolism in an Iranian diabetic/pre-diabetic population.

Materials and Methods: This case-control study was conducted on 70 participants with pre-diabetes/diabetes and 70 participants as a control group. Serum levels of insulin and visfatin were measured using ELISA kits and other parameters were determined by standard methods. The genotyping was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method.

Results: The results showed no significant differences in the levels of cholesterol, insulin, visfatin between diabetic and non-diabetic subjects ($P>0.05$). Regression analysis of genotypes showed that rs4730153 polymorphism is not associated with type 2 diabetes ($P>0.05$). There was no significant difference in genotype distribution and allelic frequencies between the insulin- sensitive, insulin- resistance, and intermediate groups ($P>0.05$). A significant difference in cholesterol levels were observed between patients with different genotypes ($P<0.05$).

Conclusion: These results indicate that there is no association between visfatin and Type 2 diabetes. There is no significant relation between rs4730153 polymorphism with diabetes and insulin resistance but it has association with lipid metabolism.

Keywords: Diabetes Mellitus, Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Adipokine, Genotype, Single nucleotide polymorphism