

بررسی متیلاسیون پروموتور ژن $TNF-\alpha$ در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو

زهرا مرادی^۱، مهرانز السادات راوری^۱، عفت فرخی^{۲*}، مرتضی هاشم زاده چالشتی^۳

چکیده

مقدمه: دیابت نوع دو شرایط التهابی مزمنی است که آمیزه‌ای از عوامل ژنتیکی و محیطی در آن نقش دارد. فاکتور نکروز توموری آلفا یا $TNF-\alpha$ به‌عنوان یک سایتوکاین پیش التهابی مترشح از بافت چربی با تأثیر بر مسیر سیگنالینگ انسولین می‌تواند در ایجاد مقاومت به انسولین در بیماران دیابت نوع دو نقش داشته باشد. با توجه اهمیت تغییرات اپی ژنتیک در ایجاد بیماری‌های چند عاملی، این مطالعه با هدف بررسی متیلاسیون پروموتور ژن $TNF-\alpha$ در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو و مقایسه‌ی آن با افراد غیر دیابتی انجام گردید.

روش‌ها: این مطالعه بر روی ۶۱ بیمار دیابت نوع دو و ۳۱ فرد غیر دیابتی انجام شد. بیماران شامل دو گروه مبتلایان کمتر از ۵ سال و مبتلایان بیشتر از ۵ سال بودند. گروه‌ها از نظر ویژگی‌های دموگرافیک همسان بودند. پروفایل لیپیدی با کیت‌های استاندارد اندازه‌گیری شد. سپس ناحیه‌ی پروموتور ژن $TNF-\alpha$ به روش تیمار با بیسولفیت، انجام Nested PCR و نهایتاً تعیین توالی بررسی گردید. یافته‌ها: در مطالعه‌ی ما ارتباطی بین متیلاسیون مناطق CpG پروموتور ژن $TNF-\alpha$ در گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. همچنین بین زنان و مردان در ارتباط با متیلاسیون پروموتور ژن $TNF-\alpha$ در گروه‌های دیابتی و غیر دیابتی تغییری مشاهده نگردید. نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد تغییرات اپی ژنتیکی سایتوکاین‌هایی که در ایجاد مقاومت به انسولین در بیماران دیابتی نوع دو نقش دارند در نمونه‌ی خون محیطی محسوس نیست و در این رابطه احتمالاً بافت‌های دیگر باید مورد بررسی قرار گیرند.

واژگان کلیدی: دیابت نوع دو، اپی ژنتیک، $TNF-\alpha$ ، متیلاسیون DNA

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه پزشکی مولکولی، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- مرکز تحقیقات مدل‌سازی در سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

***نشانی:** شهرکرد، رحمتیه، دانشکده‌ی پزشکی، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، گروه پزشکی مولکولی، تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۳۰۶۵۴، نمابر: ۳۳۳۳۰۷۰۹، پست الکترونیک: e_farrokhi_k@yahoo.com

مقدمه

امروزه دیابت در حال تبدیل شدن به یک مشکل جهانی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است. دیابت نوع دو (T2DM) با فراوانی ۹۰ درصد به عنوان شایع ترین شکل دیابت شناخته می شود [۱]. دانشمندان شیوع دیابت در سراسر دنیا را در سال ۲۰۵۰ حدود ۲۱ درصد پیش بینی کرده اند. مشخص شده است که قاره آسیا یکی از مناطقی است که دیابت نوع دو بیشترین شیوع را در آن دارد [۲]. دیابت نوع دو شرایط التهابی مزمنی است که آمیزه ای از عوامل ژنتیکی و محیطی در آن نقش دارد. علت بروز این بیماری مقاومت انسولین محیطی و کمبود ترشح انسولین به دلایلی از جمله آپوپتوز سلول های بتا پانکراس است [۳]. اگرچه پاتوفیزیولوژی دیابت به طور کامل مشخص نشده است اما ژنتیک یک بخش جدایی ناپذیر این بیماری را شکل می دهد [۳، ۴]. با این وجود این ژنتیک تنها ۱۰ تا ۱۵ درصد از موارد دیابت نوع دو را شامل می شود. در واقع خطر فاکتورهای محیطی اصلی از جمله چاقی، کمبود فعالیت فیزیکی، تغذیه مادر در دوران بارداری، مصرف سیگار توسط مادر در دوران بارداری، افزایش و کاهش وزن و استرس در زمان تولد و افزایش سن می تواند در بروز دیابت نوع دو نقش مهمی داشته باشند [۵]. چاقی به عنوان یک خطر فاکتور اصلی در بروز دیابت شرایط پیش التهابی در آدیپوسیت ها است. در افراد مستعد (از لحاظ ژنتیکی) زمانی که وزن بدن با افزایش سن بالا می رود یک حالت موازی از التهاب مزمن، که توسط افزایش سایتوکاین های پیش التهابی مشخص می شود، می تواند تغییراتی را ایجاد کند [۳]. در بافت چربی افراد چاق به دلیل تجمع چربی، مهاجرت سلول های ایمنی خصوصاً ماکروفاژها افزایش می یابد. فاکتور نکروز توموری آلفا^۱ یا $TNF-\alpha$ به عنوان یک سایتوکاین پیش التهابی مهم توسط فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ MAPK و NF κ B از این سلول های ایمنی ترشح می شود که این سایتوکاین خود سبب ترشح دیگر سایتوکاین ها از جمله IL-6 و IL-1 β می شود. $TNF-\alpha$ و IL-6 از طریق رسپتور کلاسیک انسولین (IR) سبب تحریک مسیرهای

التهابی JNK و NF- κ B/IKK- β می شوند. $TNF-\alpha$ و سایر آدیپوکاین ها با فسفریلاسیون IRS-1 از عملکرد آن برای فعالسازی مسیر PI3K/Akt جلوگیری و در نتیجه مسیر سیگنالینگ انسولین را قطع می کند [۶-۸].

با توجه به ماهیت چند عاملی دیابت فاکتورهای محیطی نقش مهمی در بروز دیابت دارند. در واقع عوامل محیطی اثر خود بر ژنوم را از طریق اپی ژنتیک اعمال می کنند [۴]. این تغییرات سبب تغییر در بیان ژن بدون تغییر در توالی DNA می شوند. سه تغییر اپی ژنتیکی اصلی شامل متیلاسیون DNA، استیلاسیون هیستون ها و سازوکارهای بر پایه RNA هستند [۹]. متیلاسیون DNA نقش مهمی در بروز دیابت نوع دو ایفا می کند. در واقع مطالعات EWAS^۲ نشان داده است که رابطه ی مهمی بین چاقی، دیابت نوع دو و BMI (Body Mass Index) با متیلاسیون DNA وجود دارد [۱۰]. شواهد در حال افزایش نشان می دهد که متیلاسیون DNA پاتوژن دیابت نوع دو را از طریق اثر بر ترشح انسولین از سلول های بتا پانکراس و مقاومت انسولین تحت تاثیر قرار می دهد.

مطالعات نشان داده است که تحت شرایط دیابت و گلوکز بالا برخی تغییرات اپی ژنتیک، از جمله افزایش استیلاسیون هیستون ها در پروموتور $TNF-\alpha$ در دیابت نوع یک و نوع دو در سلول های خون محیطی مشاهده شده است. همچنین نشان داده شده که متیلاسیون پروموتور این ژن در زنان دارای چربی بدنی مرکزی بالاتر کمتر است. بنابراین امروزه راهبردهای درمانی مبتنی بر داروهای ضد $TNF-\alpha$ گسترش یافته است [۱۱-۱۳]. با توجه اهمیت تغییرات اپی ژنتیک در ایجاد بیماری های چند عاملی، این مطالعه با هدف بررسی متیلاسیون پروموتور ژن $TNF-\alpha$ در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو و مقایسه آن با افراد غیر دیابتی انجام گردید.

روش ها

طرح مورد مطالعه بر روی نمونه های مرکز کوهورت شهرکرد صورت گرفت و با کد IR.SKUMS.REC.1396.257 در

² Epigenome-wide association studies¹ Tumor necrosis factor α

DNA (سیناکلون، EX6071، ایران) استخراج شدند. کیفیت نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ناندراپ ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) بررسی شد. تیمار بی سولفیت با استفاده از کیت (Qiagen, cat. nos. 59824 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit, Germany) صورت گرفت که در طی این فرایند سیتوزین غیرمتیله به یوراسیل تبدیل می‌شود اما سیتوزین‌های متیله بدون تغییر باقی می‌مانند.

طراحی پرایمر و انجام واکنش PCR

ناحیه‌ی پروموتری ژن TNF- α (NG_007462.1) با استفاده از روش Nested PCR و پرایمرهای متیله ویژه پروموتر تکثیر شد. در ناحیه‌ی پروموتر و 5'UTR ژن TNF- α ، در اطراف ناحیه‌ی کد کننده (CDS) ۱۰ ناحیه CpG وجود دارند که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

پرایمرهای PCR با استفاده از نرم‌افزار Meth Primer طراحی شدند. توالی‌های پرایمر برای Nested PCR در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. برنامه‌ی دمایی واکنش PCR برای هر دو مرحله عبارت بود از: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طولی‌سازی نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه. در نهایت کیفیت محصول PCR با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد بررسی شد.

محصولات PCR هر نمونه، جهت بررسی میزان متیلاسیون تعیین توالی گردید. تعیین توالی با دستگاه ABI 3500 توسط شرکت ژنومین در تهران انجام گردید.

تاریخ ۹۶/۱۱/۲۹ در کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به تصویب رسیده است. آزمایشات در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام گردید.

جمع آوری و آماده سازی نمونه‌ها

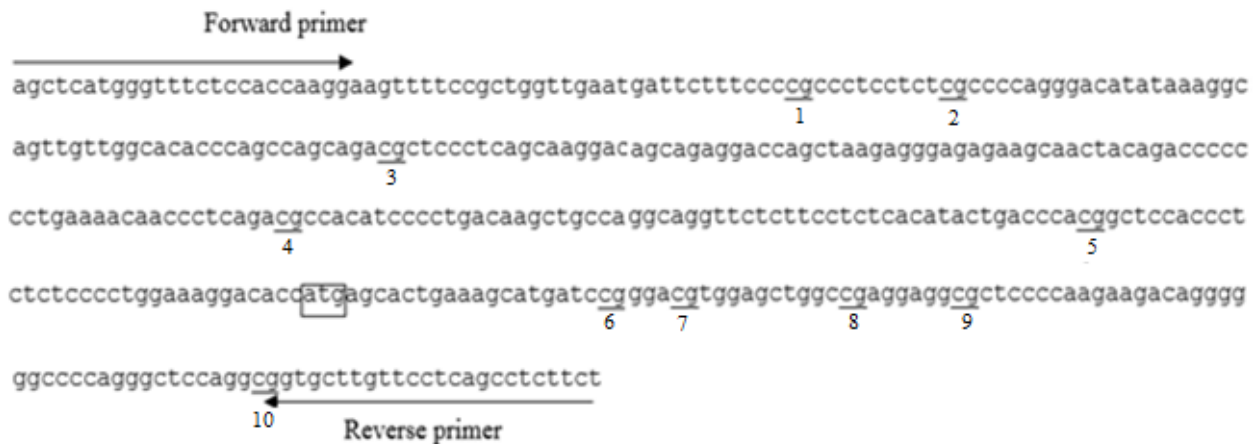
این مطالعه بر روی نمونه‌های خون افراد مبتلا به دیابت نوع دو دارای قند خون بالای ۱۸۰ mg/dl و سن بالای ۳۰ سال که به مرکز کوهورت شهرکرد مراجعه نمودند، صورت گرفت. به‌صورت تصادفی از ۶۱ نمونه خون بیمار مبتلا به دیابت نوع دو استفاده شد که با نمونه‌های خون ۳۰ فرد غیر دیابتی (کنترل) مقایسه شدند. حجم نمونه در هر گروه با استفاده از آزمون آماری محاسبه گردید. افراد دارای سن بین ۴۱ تا ۷۰ سال بودند. بیماران به دو گروه ۳۱ نفره دارای سابقه‌ی ابتلا بیشتر از ۵ سال و گروه ۳۰ نفره افراد دارای سابقه‌ی ابتلا کمتر از ۵ سال برای بیماری تقسیم شدند. گروه کنترل و بیمار از نظر سن و جنس مطابقت داشتند. گروه کنترل هیچ‌گونه سابقه‌ی خانوادگی دیابت و فشار خون بالا نداشتند و قند خون آنها کمتر از ۱۱۰ mg/dl بود.

آزمایشات بیوشیمیایی

آزمایشات بیوشیمیایی خون شامل اندازه‌گیری قند، کلسترول، تری‌گلیسرید و HDL در مرکز کوهورت شهرکرد با استفاده از کیت‌های تشخیصی پارس آزمون اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA و تیمار با بیسولفیت

نمونه‌های خون در تیوب‌های حاوی EDTA (0.5M) جمع‌آوری شدند. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج

شکل ۱- مناطق CpG در پروموتور و 5'UTR ژن *TNF-α*

۱۰ منطقه CpG این ژن بررسی شده است. شروع ناحیه‌ی کد کننده در کادر مشخص شده است. زیر پرایمرها خط کشیده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن *TNF-α* برای انجام Nested PCR

طول محصول PCR (bp)	توالی پرایمر (5' → 3')	
488	F1 GAGATAGAAGGTGTAGGGTTTATTAT R1 TCCAAAATACAACAAACAAAAAAC	پرایمرهای مرحله‌ی اول
394	F2 AGTTTATGGGTTTTTTTATTAAGG 3' R2 AAAAAAACTAAAAACAAACACC 3'	پرایمرهای مرحله‌ی دوم

در این مطالعه به جز میزان قند خون ناشتا که بین گروه‌های مورد مطالعه ارتباط معنی‌دار را نشان داد، پروفایل لیپیدی و همچنین ویژگی‌های دموگرافیک بین گروه‌های مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲). در بررسی نتایج تعیین توالی به‌دست آمده، ارتباط معنی‌داری بین متیلاسیون مناطق CpG پروموتور ژن *TNF-α* در گروه‌های مورد مطالعه وجود مشاهده نشد (جدول ۲).

تعداد متیلاسیون مناطق CpG در ژن *TNF-α* به تفکیک جنسیت در گروه‌های مورد مطالعه نیز بررسی گردید. نتایج ما اختلاف معنی‌داری را در بین زنان و مردان در ارتباط با متیلاسیون پروموتور ژن *TNF-α* را نشان نداد (جدول ۳).

بررسی‌های آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه‌ی ۱۸) صورت گرفت. از آزمون‌های one way ANOVA، کای دو و آزمون دقیق فیشر برای مقایسه‌ی میانگین گروه‌ها و متیلاسیون بین گروه‌ها استفاده شد. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۶۱ فرد مبتلا به دیابت نوع دو (۳۱ بیمار دارای سابقه‌ی ابتلا بیشتر از ۵ سال و ۳۰ بیمار دارای سابقه‌ی ابتلا کمتر از ۵ سال) با ۳۰ فرد کنترل که از نظر سن و جنس مطابقت داشتند، مقایسه شدند. پروفایل لیپیدی و متیلاسیون ۱۰ منطقه CpG از پروموتور ژن *TNF-α* بررسی شد.

جدول ۲- مقایسه ویژگی‌های دموگرافیک و پروفایل لیپیدی و میزان متیلاسیون پرموتر ژن *TNF-a* در گروه‌های مورد مطالعه

متغیرها	کنترل	گروه با سابقه ابتلا کمتر از ۵ سال	گروه با سابقه ابتلا بیشتر از ۵ سال
جنسیت*			
مرد	۱۰ (۳۳/۳)	۱۰ (۳۳/۳)	۱۲ (۳۸/۷)
زن	۲۰ (۶۶/۷)	۲۰ (۶۶/۷)	۱۹ (۶۱/۳)
سن	۵۴/۵±۸/۶	۵۵/۹±۸/۱	۵۵/۳±۸/۲
BMI (kg/m ²)	۲۸/۴±۴/۶	۳۰/۲±۵/۳	۲۸/۵±۳/۸
قند خون ناشتا (mg/dl)	۹۰/۹±۲/۴	۱۱۵/۵±۴/۳**	۱۵۵/۶±۱۵/۱**
کلسترول (mg/dl)	۱۹۷/۱±۷/۳	۱۷۹/۵±۷/۷	۱۸۳/۵±۸/۲
تری گلیسرید (mg/dl)	۱۶۴/۳±۱۵/۱	۱۶۸/۹±۱۴/۴	۱۵۹/۳±۱۳/۷
HDL (mg/dl)	۵۱/۱±۲/۱	۵۰/۹±۲/۱	۴۹/۶±۲/۴
میانگین تعداد متیلاسیون <i>TNF-a</i> CpG	۰/۴۷±۰/۱	۰/۴۷±۰/۱	۰/۵۲±۰/۱

* ۳۰ نمونه کنترل، ۳۱ بیمار دارای سابقه ابتلا بیشتر از ۵ سال و ۳۰ بیمار دارای سابقه ابتلا کمتر از ۵ سال بررسی شدند.

** متغیر جنس با فراوانی (درصد) و سایر متغیرها به صورت Mean ± SEM ذکر گردیده‌اند.

** P < ۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل

جدول ۳ - مقایسه تعداد متیلاسیون مناطق CpG در ژن *TNF-a* به تفکیک جنسیت در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه‌ها	جنس	میانگین تعداد متیلاسیون
CpG <i>TNF-a</i>	کنترل	مرد	۰/۵۰±۰/۲
		زن	۰/۴۵±۰/۱
متغیر	بیمار	مرد	۰/۴۱±۰/۱
		زن	۰/۵۴±۰/۱

تعداد مناطق CpG بررسی شده در ژن *TNF-a* در ۳۱ فرد غیر دیابتی و ۶۱ فرد دیابتی که با روش تیمار بیسولفیت و تعیین توالی بررسی شدند. متغیرها به صورت Mean ± SEM مشخص شده است.

بحث

سعی شده است که متیلاسیون ژن *TNF-a* که در مسیر مولکولی دیابت نقش دارد، بررسی شود. در این روش از تیمار بیسولفیتی که روش اصلی برای بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌ها است، استفاده شد. در این حالت سیتوزین‌های غیرمتیله به یوراسیل تبدیل می‌شوند که در طی واکنش PCR یوراسیل‌ها به تیمین تبدیل می‌شوند اما سیتوزین‌های متیله بدون تغییر باقی می‌مانند که پس از توالی‌یابی قابل تشخیص هستند. ژن *TNF-a* در مسیر مولکولی پاتوژنز دیابت به نوعی نقش اولیه دارد و

امروزه مشخص شده است که در ایجاد بیماری‌های چند عاملی علاوه بر تغییرات ژنتیکی، تغییرات اپی‌ژنتیک نقش مهمی دارد. بیماری دیابت نیز یک بیماری چند عاملی است که در طی چند سال مطالعه و کشف ژن‌های متعدد که در ایجاد بخش ژنتیکی آن نقش دارند مشخص شده است که عوامل محیطی در ایجاد آن نقش مهمی دارند. با توجه به این موضوع در این مطالعه

نشندند در مقایسه با افراد سالم نشان داد که پروموتور ژن *TNF-α* در افرادی که با دارو به طور مناسبی کنترل نشدند کمتر متیله شده است [۱۵]. ما میزان کنترل دیابت در بیماران را بررسی نکردیم و احتمالاً عدم مشاهده تغییر در میزان متیلاسیون می تواند با کنترل دیابت در بیماران مورد مطالعه ما مربوط باشد.

مطالعات اپی ژنتیک بر روی بافت خون که یک نمونه‌ی قابل دسترس است نسبت به سایر بافت‌هایی که در ارتباط با ایجاد دیابت هستند می تواند در تشخیص زودرس بیماری کمک کننده باشد. علی‌رغم اینکه ما تغییر در متیلاسیون پروموتور ژن *TNF-α* در نمونه‌ی خون محیطی بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نکردیم، شاید بتوان با مطالعه اپی ژنتیکی سایر ژن‌های دخیل در پاتوژنز بیماری در خون محیطی، از نمونه‌ی خون به عنوان مارکر در تشخیص و درمان بیماری دیابت بهره برد.

نتیجه گیری

به نظر می‌سد تغییرات اپی ژنتیکی سایتوکاین‌هایی مانند *TNF-α* که در ایجاد مقاومت به انسولین در بیماران دیابتی نوع دو نقش دارند در نمونه خون محیطی محسوس نیست و در این رابطه احتمالاً بافت‌های دیگر باید مورد بررسی قرار گیرند.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم زهرا مرادی دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک است. هزینه‌ی این مطالعه توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تأمین گردیده است که بدین وسیله تقدیر و تشکر می‌گردد. از پرسنل محترم مرکز کوهورت دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که در جمع‌آوری نمونه‌ها و انجام آزمایشات بیوشیمی ما را یاری کردند و همچنین افراد شرکت کننده در مطالعه تقدیر و تشکر می‌گردد.

باعث شروع وقایع مولکولی بعدی می‌شود. *TNF-α* اولین سایتوکین ترشحی از ماکروفاژهای تجمعی در بافت چربی است که آغازگر ترشح و فعال سازی سایر سایتوکاین‌ها و آپوپتوز جزایر β لانگرهانس یا قطع مسیر سیگنالینگ انسولین (ایجاد مقاومت انسولین در بافت‌های چربی سفید، کبد و ماهیچه به عنوان یکی از دلایل اصلی ایجاد دیابت) و متعاقباً فعال سازی مسیرهای آنزیمی درون سلولی می‌شود که باعث ایجاد شرایط التهابی و تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) در دیابت می‌شوند [۱۱].

در مورد ژن *TNF-α* تاکنون چندین مطالعه در افراد مبتلا به دیابت و یا بررسی وضعیت متیلاسیون پروموتور آن در افراد دارای چربی بالا صورت گرفته است. در یک بررسی که در سال ۲۰۱۶ به منظور بررسی سطح سرمی برخی سایتوکاین‌ها از جمله *TNF-α* در دیابت نوع دو انجام شد نشان داد که خطر بروز دیابت نوع دو به میزان زیادی با افزایش سطح سایتوکاین‌های التهابی از جمله *TNF-α*، *IL-1β*، *IL-6*، *IL-18* و *CRP* مرتبط است [۱۴]. همچنین برخی مطالعات نشان داد در زنان دارای چاقی مرکزی بالاتر پروموتور ژن *TNF-α* دارای متیلاسیون کمتر است اما سطح پلاسمایی آن بالاتر است [۱۳]. مطالعه‌ی ما ارتباطی بین متیلاسیون پروموتور ژن *TNF-α* و دیابت نوع دو نشان نداد. همانگونه که می‌دانیم کنترل بیان ژن‌ها به واسطه‌ی تغییرات اپی ژنتیکی، علاوه بر متیلاسیون *DNA*، از مسیرهای دیگری مانند تغییرات هیستونی و *micro RNA* نیز صورت می‌گیرد. احتمال دارد عدم مشاهده متیلاسیون در پروموتور *TNF-α* در مطالعه‌ی ما به خاطر نقش سایر مسیرهای تنظیمی باشد. از طرفی با توجه به اینکه میزان *BMI* در گروه‌های مورد مطالعه‌ی ما اختلاف معنی‌داری نداشت می‌تواند دلیل دیگری بر عدم مشاهده اختلاف در میزان متیلاسیون در گروه‌های مورد مطالعه باشد. چرا که مطالعات نشان داده وجود چاقی می‌تواند عامل مؤثری در تغییرات اپی ژنتیکی ژن *TNF-α* باشد [۱۳].

اخیراً یک بررسی بر روی هیدروکسی متیلاسیون و متیلاسیون کلی *DNA* در سلول‌های خونی بیماران دیابت نوع دو که با دارو به خوبی کنترل شدند و بیمارانی که به طور مناسبی کنترل

مآخذ

1. 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(11):1185-200.
2. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology* [Review Article]. 2017; 14:88.
3. Kameswaran V, Bramswig NC, McKenna LB, Penn M, Schug J, Hand NJ, et al. Epigenetic regulation of the DLK1-MEG3 microRNA cluster in human type 2 diabetic islets. *Cell Metab* 2014; 19(1):135-45.
4. Kwak SH, Park KS. Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes. *Exp Mol Med* 2016; 48:e220.
5. Nilsson E, Ling C. DNA methylation links genetics, fetal environment, and an unhealthy lifestyle to the development of type 2 diabetes. *Clin Epigenetics* 2017; 9:105.
6. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* 2013; 2013:139239
7. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444(7121):840-6.
8. Nicholas DA, Andrieu G, Strissel KJ, Nikolajczyk BS, Denis GV. BET bromodomain proteins and epigenetic regulation of inflammation: implications for type 2 diabetes and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(2):231-43.
9. Sommese L, Zullo A, Mancini FP, Fabbri R, Soricelli A, Napoli C. Clinical relevance of epigenetics in the onset and management of type 2 diabetes mellitus. *Epigenetics* 2017; 12(6):401-15.
10. Al Muftah WA, Al-Shafai M, Zaghlool SB, Visconti A, Tsai P-C, Kumar P, et al. Epigenetic associations of type 2 diabetes and BMI in an Arab population. *Clinical epigenetics* 2016; 8: 13.
11. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem* 2018; 119(1):105-10.
12. Miao F, Gonzalo IG, Lanting L, Natarajan R. In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J Biol Chem* 2004; 279(17):18091-7.
13. Hermsdorff HH, Mansego ML, Campión J, Milagro FI, Zulet MA, Martínez JA. TNF-alpha promoter methylation in peripheral white blood cells: Relationship with circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine* 2013; 64(1):265-71.
14. Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q, Hua M. Adiponectin, TNF-alpha and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* 2016; 86:100-9.
15. Pinzon-Cortes JA, Perna-Chaux A, Rojas-Villamizar NS, Diaz-Basabe A, Polania-Villanueva DC, Jacome MF, et al. Effect of diabetes status and hyperglycemia on global DNA methylation and hydroxymethylation. *Endocr Connect* 2017; 6(8):708-25

INVESTIGATION OF METHYLATION OF TNF- α GENE PROMOTER IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES

Zahra Moradi¹, Mehrnaz Sadat Ravari¹, Effat Farrokhi^{2*}, Morteza Hashemzadeh haleshtori³

1. Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2. Department of Molecular Medicine, School of Advanced Technologies, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

3. Modeling in Health Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

ABSTRACT

Background: Type II diabetes is a chronic inflammatory condition that is associated with a combination of genetic and environmental factors. Tumor necrosis factor alpha or TNF- α as an adipocyte cytokine, which affects the signaling pathway of insulin, can contribute to insulin resistance in type 2 diabetes patients. Considering the importance of epigenetic changes in multifactorial diseases, this study aimed to investigate TNF- α promoter methylation in patients with type 2 diabetes.

Methods: This study was performed on 61 patients with type 2 diabetes and 31 non-diabetic patients. The Groups were matched in terms of demographic characteristics. The lipid profiles were measured by standard kits. TNF- α promoter methylation levels were measured by bisulphite treatment method, Nested PCR and sequencing.

Results: There was no association between TNF- α promoter methylation gene promoter and type 2 diabetes in the studied groups. Also, there was no association between TNF- α promoter methylation in diabetic and non-diabetic groups between males and females.

Conclusion: The epigenetic changes in cytokines that contribute to insulin resistance in type 2 diabetic patients seem to be ineffective in peripheral blood samples, and other tissues may need to be investigated in this regard.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, Epigenetic, TNF- α , DNA methylation

*Department of Molecular Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Rahmatieh, Shahrekord, Iran. Tel: +98 3833335654
fax: +983833330709. E-mail: e_farrokhi_k@yahoo.com