

بررسی ارتباط دو واریانت rs10882283 و rs10882273 ژن rbp4 با زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه کننده به کلینیک تخصصی و فوق تخصصی دیابت و بیماری‌های متابولیک تهران

مریم مرتضایی¹، عباسعلی راز²، شعله منصوری³، زهره عنابستانی⁴، زهرا میرزایی زاده⁵، باقر لاریجانی³، مهرداد هاشمی¹، کبری امیدفر^{5*}

چکیده

مقدمه: مقاومت به انسولین و نارسایی پیشرونده سلول‌های بتا، فاکتورهای کلیدی در بیماری‌زایی دیابت نوع دو هستند. مطالعات متعددی نشان‌دهنده نقش RBP4 در بروز مقاومت به انسولین و ابتلا به دیابت بوده و لذا پلی‌مورفیسم‌هایی که بر روی بیان و یا عملکرد این ژن تأثیر بگذارند، در خطر ابتلا به T2DM و عوارض آن می‌توانند نقش داشته باشند. پای دیابتی از جمله عوارض اصلی دیابت شیرین است که علت اصلی ناتوانی و بستری شدن بیماران می‌باشد و علاوه بر کاهش شدید کیفیت زندگی فرد هزینه‌های فراوانی را به وی تحمیل می‌کند. هدف این مطالعه، بررسی ارتباط دو پلی‌مورفیسم rs10882283 و rs10882273 ژن rbp4 با پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو است تا در صورت تایید همبستگی، از آن به عنوان مارکر زیستی پیش‌آگهی‌دهنده استفاده شود.

روش‌ها: این مطالعه از نوع مورد-شاهد است. دو پلی‌مورفیسم rs10882283 و rs10882273 ژن rbp4 در 100 بیمار دیابتی دارای زخم پا با درجه 1 یا 2 از طبقه‌بندی وگنر در گروه مورد و 133 بیمار دیابتی فاقد زخم در گروه شاهد، با استفاده از تکنیک Tetra ARMS PCR تعیین ژنوتیپ گردید.

یافته‌ها: آزمون Chi-square بین دو گروه شاهد و مورد، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را در فراوانی ژنوتیپ‌های (CC)، (CT) و (TT) rs10882273 نشان نداد ($P=0/414$). همچنین مقایسه ژنوتیپ‌های (CC)، (AC) و (AA) متعلق به پلی‌مورفیسم rs10882283 در دو گروه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین دو گروه نبود ($P=0/85$).

نتیجه‌گیری: طبق این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم‌های rs10882283 و rs10882273 ژن rbp4 و خطر ابتلای به زخم پای دیابتی در بین افراد مبتلا به دیابت نوع دو وجود ندارد.

واژگان کلیدی: دیابت نوع دو، rbp4، پلی‌مورفیسم، پای دیابتی

1- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

2- گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

3- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

4- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی-مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

5- مرکز تحقیقات دیابت، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*نشانی: خیابان کارگر شمالی، خیابان جلال آل احمد، بیمارستان شریعتی، طبقه پنجم، مرکز غدد درون‌ریز و متابولیسم، تلفن: 88220037

پست الکترونیک:omidfar@tums.ac.ir

مقدمه

بافت چربی² و به صورت اختصاصی چربی احشائی در ایجاد دیابت نوع دو نقش اساسی دارد و با ترشح³ FFA و ادیپوکاین‌ها موجب بروز مقاومت به انسولین⁴ و اختلال سلول‌های بتا⁵ می‌شود [7]. ادیپوکاین‌ها فاکتورهای فعال بیولوژیکی هستند که بر سیستم ایمنی و متابولیسم اثرات موضعی و سیستمیک می‌گذارند.⁶ RBP4 پروتئینی از خانواده لیپوکالین‌ها می‌باشد و وظیفه انتقال رتینول را در گردش خون، از کبد به بافت‌های محیطی بر عهده دارد اما اخیراً نقش آن به عنوان ادیپوکاین نیز مورد توجه قرار گرفته است [8-11]. این ادیپوکاین، حساسیت به انسولین کبدی و محیطی را کاهش داده و گلوکوئوتوژنز کبدی را افزایش می‌دهد، از این رو می‌تواند موجب افزایش استعداد ابتلا به دیابت نوع دو گردد [12-15]. واریانت‌های ژنی که بیان و یا عملکرد rbp4 را تغییر می‌دهند نیز بر استعداد ابتلا به دیابت نوع دو و مقاومت به انسولین موثر خواهند بود [16]. ارتباط دو پلی‌مورفیسم rs10882283 و rs10882273 و هاپلوتاایپ‌های شامل این دو SNP⁷ با چاقی، سطح سرمی RBP4، مقاومت به انسولین، دیابت نوع دو و نمایه توده بدنی (BMI)⁸ در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله افزایش معنی‌دار آن‌ها در نژاد قفقازی⁹ مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با کنترل‌های سالم مشاهده شده است و نیز با BMI افزایش یافته و نسبت دور کمر به دور باسن در این نژاد ارتباط دارند [17، 18]. مطالعات زیادی در زمینه نقش RBP4 در عوارض ماکروواسکولار و بعضی عوارض میکروواسکولار خصوصاً نفروپاتی و نوروپاتی دیابت نوع دو انجام شده است [19-21] ولی تاکنون نقش آن در ایجاد زخم پای دیابتی مورد بررسی قرار نگرفته است. هدف پروژه حاضر تعیین چند شکلی‌های ژن rbp4 و ارتباط آن با زخم پای دیابتی و محاسبه میزان خطر ابتلا در صورت تایید همبستگی می‌باشد. مطالعه ما بر روی rs10882283 و rs10882273 انجام گرفت. هر دو پلی‌مورفیسم در منطقه 5'UTR ژن rbp4 قرار دارند. براساس

دیابت شیرین یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غیرواگیر در جهان است که چهارمین یا پنجمین علت مرگ در اکثر کشورهای توسعه یافته جهان می‌باشد که این آمار مشابه رقمی است که برای ایدز گزارش شده است [1]. در بروز دیابت شبکه پیچیده‌ای از عوامل خطرزای محیطی و ژنتیکی نقش دارند و چنانچه بدون درمان رها شود، موجب ایجاد عوارض متعددی از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، سکته مغزی، نارسایی کلیه، آسیب به چشم‌ها و زخم پا می‌شود [2]. 3 نقص محوری که آغاز افزایش قند خون¹ را در دیابت نوع دو نشان می‌دهد، شامل تولید گلوکز کبدی افزایش یافته، ترشح انسولین کاهش یافته و عملکرد مختل شده انسولین می‌باشد [3، 4]. پیش‌بینی می‌شود شیوع دیابت تا سال 2030 به بیش از نیم میلیارد نفر در جهان خواهد رسید (آنفر از هر 10 نفر) [1]. هزینه‌های سلامت در سال 2013 برای دیابت معادل 11% از کل هزینه بهداشت جهانی بوده است و در ایران بیشترین سهم هزینه سرانه دیابت با 412/8±64/5 دلار (48/9%) مربوط به عوارض بیماری می‌باشد. زخم پای دیابتی یکی از عوارض اصلی و دیررس دیابت شیرین است که علت اصلی ناتوانی و بستری شدن بیماران محسوب شده و موجب کاهش شدید کیفیت زندگی فرد می‌گردد. خطر ابتلا به زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت در حدود 15% می‌باشد و 85% از تمام موارد قطع عضو تحتانی وابسته به دیابت، دارای زخم پا می‌باشند [5، 6]. اگرچه پیشرفت‌های گوناگونی در زمینه درمان زخم پا حاصل شده است اما بیشتر این درمان‌ها اثرات نسبی داشته و مکمل یکدیگر هستند، به‌علاوه برای بیماران هزینه بردار نیز می‌باشد. بنابراین مشخص نمودن افراد با خطر بالای ابتلا به زخم پای دیابتی حائز اهمیت است، زیرا به این وسیله می‌توان عوارض ابتلا به بیماری را تا حد زیادی کاهش داد. یافتن مارکری زیستی جهت شناسایی بیماران تحت خطر، کمک می‌کند تا با هشدار به افراد مستعد، تغییر در روش زندگی و فاکتورهای محیطی کمک کننده به ایجاد زخم و به‌طور کلی مدیریت نمودن بیماری، بروز علائم بیماری را به تاخیر انداخته و یا در صورت بروز شدت آن را کاهش داد.

¹ Hyperglycemia² Adipose tissue³ Free Fatty Acid⁴ Insulin Resistance⁵ Beta-Cell dysfunction⁶ Retinol Binding Protein4⁷ Single Nucleotide Polymorphism⁸ Body Mass Index⁹ Caucasian

نوکلئوتیدی است، انجام شد. در این تکنیک به منظور شناسایی هر پلی مورفیسم به چهار پرایمر نیاز می باشد که عبارتند از یک جفت پرایمر خارجی¹ Universal¹ و یک جفت پرایمر داخلی² اختصاصی آلل³ که در انتهای '3 دارای عدم تطابق⁴ می باشد [23، 24]. بنابراین در این تکنیک برای فرد هموزیگوت 2 باند و برای فرد هتروزیگوت 3 باند در ژل آگارز مشاهده خواهد شد. با توجه به طراحی هوشمندانه انجام شده، برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه تنها به یک واکنش PCR نیاز می باشد (برخلاف تکنیک ARMS PCR که به دو واکنش PCR نیاز دارد) که این ویژگی، موجب افزایش سرعت تشخیص و صرفه جویی در مصرف مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR می گردد.

پرایمرهای به کار رفته برای موقعیت rs10882273:

5'-
AGGTGACACTATAGAATAACTATGCACTGCCT
TTAATGCTGATAT-3': Inner forward normal
5'-
GTACGACTCACTATAGCGACAGCCGGGTACC
CCTCG-3': Inner Reverse mutant
5'-
AGGTGACACTATAGAATACTGTGTGAATGGG
GGAAG-3': Outer forward
5'-
GTACGACTCACTATAGCGAACTCCTAGGCCCT
ATGTG-3': Outer reverse

پرایمرهای بکار رفته برای موقعیت rs10882283:

5'-GCGCCACACCCACTTCATCTTGCCAG-3':
Outer Wild
Outer Mutant :5'-
CCGGCGCCTCCCCTTCGGTCTTTCAC-3'
Inner Wild :5'-
GCCTCCCTCACTCCACGCGCCCCGGACT-3'
Inner Mutant: 3' -5'-
GGAACCGCACGCAAGCCTGGCCGCCGC

(نوکلئوتیدهای **bold** و ایتالیک عدم تطابق های اصلی و نوکلئوتیدهای دارای زیر خط، عدم تطابق های اضافه می باشند) تعیین ژنوتیپ در موقعیت rs10882273 با برنامه PCR در حجم 20 ماکرولیتر و دارای سه مرحله، به شرح زیر انجام شد: ابتدا DNA ژنومیک به مدت 5 دقیقه در دمای 94 درجه

بررسی های ما تا کنون مطالعه ای بر روی ارتباط واریانت های ژنتیکی این ژن با زخم پای دیابتی صورت نگرفته است و این مطالعه برای اولین بار در کشور ما انجام شده است.

روش ها

این پژوهش به روش مورد-شاهد انجام شده است و با توجه به معیارهای ورود به مطالعه، تعداد 233 بیمار، شامل 100 نفر در گروه مورد و 133 نفر در گروه شاهد، تحت نظر پزشک از بیماران دیابتی مراجعه کننده به کلینیک تخصصی دیابت و بیماری های متابولیک تهران، جمع آوری گردید. گروه مورد، شامل بیماران دیابتی با زخم پای دیابتی درجه 1 یا 2 مطابق با طبقه بندی وگنر و گروه شاهد، بیماران دیابتی بدون زخم پا و یا سابقه ابتلا به زخم پای دیابتی بودند. معیارهای ورود به مطالعه عبارتند از ابتلا به دیابت نوع دو، سن بالای 40 سال، زخم پا با درجه 1 یا 2 براساس طبقه بندی وگنر و معیارهای خروج از مطالعه عبارتند از زخم پا با درجه 3 یا 4 از طبقه بندی وگنر، مصرف مکمل های ویتامینی (ویتامین B12 و اسید فولیک)، کراتین بالای 2mg/dl سیروز کبدی، sever retinopathy نارسایی قلبی کلاس 3 یا 4 (براساس NYHR) و وجود سایر بیماری هایی که منجر به نوروپاتی به غیر از دیابت می شود. برای تمامی افراد داوطلب جهت شرکت در طرح، فرم شرح حال اطلاعات عمومی و بالینی توسط پژوهشگر تکمیل گردیده و نمونه خون کامل افراد در لوله های حاوی EDTA جهت بررسی های ژنتیکی جمع آوری شد. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی توسط کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ نمونه ها:

ابتدا استخراج لنفوسیت براساس روش Harris و همکاران [22] و پس از آن، استخراج DNA به روش salting out انجام گرفت. غلظت نمونه ها به کمک نانودراپ تعیین گردید. آنالیز مولکولی پلی مورفیسم rs10882283 و rs10882273، برای اولین بار با Tetra ARMS PCR که تکنیکی دقیق، سریع و اقتصادی جهت شناسایی پلی مورفیسم های تک

¹ Outer primer
² Inner primer
³ allele specific
⁴ Miss match

طول قطعات تکثیر شده برای پلی مورفیسم rs10882283 براساس پرایمرهای طراحی شده به شرح زیر می باشد: قطعه کنترل: 322bp - قطعه نرمال: 217bp - قطعه جهش یافته: 144bp محصول PCR روی ژل آگارز 2% مشاهده شد. نمونه های هتروزیگوت 3 باند (طبیعی، جهش یافته و کنترل) و نمونه های هموزیگوت 2 باند (طبیعی یا جهش یافته همراه باند کنترل) را نشان دادند (شکل 1 و 2). در پایان، به منظور تایید صحت نتایج، برای تعدادی از نمونه ها تعیین توالی⁴ به صورت دو طرفه انجام گرفت.

روش های آماری: آنالیز آماری داده ها توسط نرم افزار SPSS ویرایش 16 انجام گرفت. با استفاده از آزمون آماری Explor مشخص گردید که داده ها از توزیع نرمال پیروی نمی کنند ($P \leq 0/05$)، لذا از تست آماری نان پارامتریک Chi-Square برای مقایسه دو متغیر کیفی استفاده گردید.

یافته ها

نتایج حاصل از مطالعه و فراوانی هر ژنوتیپ در جدول شماره 1 بیان شده است. آنالیزهای آماری در دو گروه مورد و شاهد نشان دادند که تفاوت فراوانی ژنوتیپ های مختلف موقعیت rs10882273 (TT, CT, CC) به لحاظ آماری معنی دار نیستند ($P=0/414$). این موتاسیون در قالب مقایسه فراوانی افراد دارای آلل موتانت (CT, CC) بین دو گروه دارای زخم (92%) و فاقد زخم (91/7%) نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به همان شکل فاقد اعتبار آماری بودند.

به علاوه هر دو گروه با استفاده از آزمون Chi-square از نظر فراوانی ژنوتیپ های مختلف rs10882283 (AA, AC, CC) نیز مقایسه شدند و نتایج نشان دهنده اختلاف معنی داری در فراوانی ژنوتیپ ها در گروه مورد نسبت به شاهد نبود ($P=0/85$). فراوانی افراد دارای آلل موتانت (AC, CC) در موقعیت rs10882283 بین گروه دارای زخم (74/5%) و فاقد زخم (77/7%) نیز نسبت به یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت که با محاسبه $P=0/34$ مشخص شد در این زمینه نیز اختلاف معنی داری وجود ندارد.

سانتی گراد و اسرشت¹ گردید و سپس 8 سیکل PCR انجام شد که هر سیکل شامل 30 ثانیه حرارت 94 درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون، 30 ثانیه حرارت 62 درجه سانتی گراد برای عمل ملحق شدن² و 30 ثانیه حرارت 72 درجه سانتی گراد برای تکثیر³ DNA بود. پس از آن 8 سیکل دیگر انجام شد که هر سیکل شامل 30 ثانیه حرارت 94 درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون، 30 ثانیه حرارت 52 درجه سانتی گراد برای عمل ملحق شدن و 30 ثانیه حرارت 72 درجه سانتی گراد برای تکثیر بود. 20 سیکل بعدی هر یک شامل 30 ثانیه حرارت 94C برای دناتوراسیون، 30 ثانیه حرارت 64 درجه سانتی گراد برای عمل ملحق شدن و 30 ثانیه حرارت 72 درجه سانتی گراد برای تکثیر بود و در نهایت 10 دقیقه برای تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی گراد قرار داده شد. برنامه PCR برای تعیین ژنوتایپ در موقعیت rs10882283 در حجم 30 ماکرولیتر بدین ترتیب انجام گرفت: ابتدا DNA ژنومیک به مدت 5 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی گراد دناتوره و سپس 22 سیکل PCR انجام شد که هر سیکل شامل 30 ثانیه حرارت 94 درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون، 20 ثانیه حرارت 77 درجه سانتی گراد برای عمل ملحق شدن و 12 ثانیه حرارت 72 درجه سانتی گراد برای تکثیر DNA بود. 25 سیکل بعدی هر یک شامل 30 ثانیه حرارت 94 درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون، 20 ثانیه حرارت 73C برای عمل ملحق شدن و 17 ثانیه حرارت 72 درجه سانتی گراد برای تکثیر بود و در نهایت 10 دقیقه برای تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی گراد قرار داده شد. نکته قابل توجه در بهینه سازی آزمایش برای rs10882283 استفاده از دمای اتصال بالا، کاهش زمان اتصال و تکثیر و استفاده از DMSO است که تمامی استراتژی های مذکور جهت تکثیر موفقیت آمیز ژن ها در نواحی غنی از G و C (نظیر موقعیت rs10882283) می باشد. طول قطعات تکثیر شده برای پلی مورفیسم rs10882273 براساس پرایمرهای طراحی شده به شرح زیر می باشد: قطعه کنترل: 250bp - قطعه نرمال: 100bp - قطعه جهش یافته: 150 bp

¹ Denaturation

² Annealing

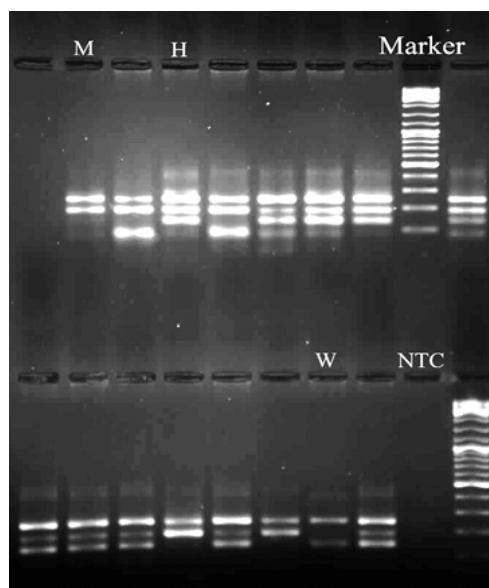
³ Extension

⁴ Direct sequencing

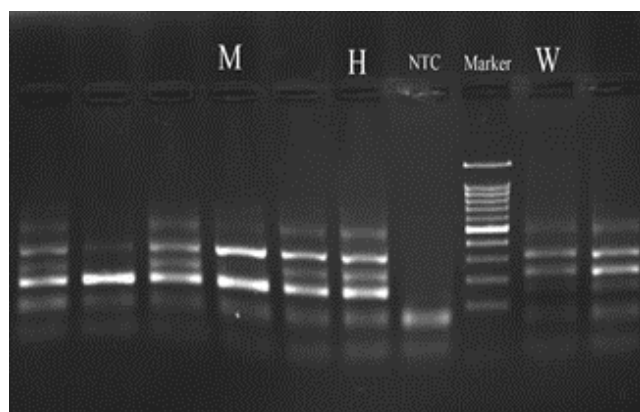
جدول 1- توزیع شیوع ژنوتیپ‌های rs10882273 و rs10882283 در دو گروه مورد و شاهد

rs10882273			rs10882283			مورد	تعداد
طبیعی	جهش یافته	هتروزیگوت	طبیعی	جهش یافته	هتروزیگوت		
TT	CC	TC	AA	CC	AC	8	26
24	29	41	25/5	30/9	43/6	26	66
8	26	66	25/5	30/9	43/6	26	66
11	45	77	29	41	60	11	45
8/3	33/8	57/9	22/3	31/5	46/2	8/3	33/8

p≤0/05: معنی دار



شکل 1- نتایج تعیین ژنوتایپ موقعیت rs10882273 در بیماران مبتلا به دیابت نوع 2 توسط تکنیک تترآرمز PCR بر روی ژل آگارز 2%
 M: آلل جهش یافته (CC)، W: آلل طبیعی (TT)، H: هتروزیگوت (آلل TC). NTC: کنترل منفی



شکل 2- نتایج تعیین ژنوتایپ موقعیت rs10882283 در بیماران مبتلا به دیابت نوع 2 توسط تکنیک تترآرمز PCR بر روی ژل آگارز 2%
 M: آلل جهش یافته (CC)، W: آلل طبیعی (AA)، H: هتروزیگوت (آلل AC). NTC: کنترل منفی

بحث

rs1088273 که در منطقه تنظیمی ژن واقع شده‌اند، با خطر ابتلای به زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو پرداختیم. نتایج نشان دادند که ارتباط معناداری بین دو پلی مورفیسم مورد مطالعه و افزایش خطر ابتلا به زخم پای دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو وجود ندارد ($P \geq 0/05$). البته بالا بودن فراوانی آلل جهش یافته مربوط به هر دو پلی مورفیسم مورد بررسی، می‌تواند نشان دهنده ارتباط آن‌ها با بیماری دیابت در جمعیت ایران باشد. پیشنهاد می‌شود، در مطالعات آینده فراوانی الی rs1088283 و rs1088273 در افراد غیردیابتی (سالم) کشورمان بررسی شده و با داده‌های حاصل از این مطالعه مقایسه گردد تا ارتباط آن‌ها با ابتلا به دیابت در جمعیت ایران نیز مشخص شود. به‌علاوه ارتباط این دو پلی مورفیسم با سکنه قلبی، سکنه مغزی، نوروپاتی،³ABI و BMI به‌عنوان سایر فاکتورهای موثر در خطر ابتلا به زخم پای دیابتی، مشخص گردد.

سپاسگزاری

اجرای این مطالعه با حمایت مالی پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. از تمام همکارانی که در این مرکز و کلینیک تخصصی دیابت و بیماری‌های متابولیک تهران نهایت همکاری را مبذول داشتند و نیز از جناب آقای دکتر حمزه علیپور که آنالیزهای آماری طرح را انجام دادند قدردان و سپاسگزاریم.

RBP4، پروتئینی است که وظیفه‌ی انتقال رتینول در گردش خون، از کبد به بافت‌های محیطی را بر عهده دارد اما اخیراً نقش آن به عنوان ادیپوکاین نیز مورد توجه قرار گرفته است [25-28]. ادیپوکاین‌ها فاکتورهای فعال بیولوژیکی هستند که از بافت چربی به عنوان ارگانی درون‌ریز، ترشح شده و بر سیستم ایمنی و متابولیسم اثرات موضعی و سیستمیک می‌گذارند. RBP4 فاکتوری مشتق از بافت چربی است که، حساسیت به انسولین کبدی و محیطی را کاهش داده و گلوکونئوژنز کبدی را نیز افزایش می‌دهد. از این رو می‌تواند موجب افزایش استعداد ابتلا به دیابت نوع 2 گردد. سطح سرمی RBP4 در بیماران با مقاومت به انسولین، دیابت نوع 2¹ IGT و دیابت بارداری افزایش می‌یابد [12-15، 29]. مطالعات گذشته نشان دادند که RBP4 بیان آنزیم کبدی²PEPCK را تحریک کرده و پیام‌رسانی انسولین را دچار اختلال می‌کند [30، 31]. بنابراین RBP4 به عنوان یک فاکتور انتهایی، نقش واسطه‌ای بین بافت چربی و بافتهای هدف انسولین دارد. لازم به ذکر است که نقش RBP4 در افزایش خطر ابتلا به دیابت، مقاومت به انسولین، چاقی و تغییر در ترشح انسولین در تعدادی از مطالعات بالینی مورد تایید قرار نگرفته است [12، 31] که می‌تواند تحت تاثیر فاکتورهای مداخله‌گر و تفاوت در پیش زمینه‌ی ژنتیکی جمعیت‌ها باشد. اما تمامی مطالعاتی که بر روی موش‌ها انجام شده است، عملکرد این ادیپوکاین را در این زمینه تایید می‌کند [32]. تحقیقات نشان می‌دهند که نقش واریانت‌های ژنتیکی ژن *rbp4* در استعداد ابتلا به بیماری دیابت نوع دو و مقاومت به انسولین، احتمالاً از طریق تأثیر آن‌ها بر روی میزان بیان ژن *rbp4* می‌باشد [17]. مطالعات بسیار کمی در مورد تاثیر گوناگونی ژنتیکی *rbp4* بر افزایش خطر متابولیک در انسان‌ها گزارش شده است. مطالعات پلی مورفیسم *rbp4* در نژاد قفقازی نشان داده‌اند که rs1088273، rs1088283 و یا هاپلوتایپ‌های آن‌ها با افزایش انسولین پلاسمای ناشتا، نمایه توده بدنی، نسبت دور کمر به دور باسن و نیز با T2DM ارتباط دارد [17، 18]. این دو پلی مورفیسم در منطقه 5'UTR ژن *rbp4* قرار دارند. ما در این پژوهش برای اولین بار به بررسی ارتباط rs1088283 و

¹ Impaired Glucose Tolerance² Phosphoenolpyruvate carboxykinase³Ankle Bracial Index

مآخذ

1. IDF Diabetes Atlas I Sixth edition.
2. "Diabetes Fact sheet N°312". WHO.
3. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes care* 1992;15(3):318-68.
4. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* 2005; 365(9467):1333-46.
5. Frykberg RG. Diabetic foot ulcers: pathogenesis and management. *American family physician*. 2002; 66(9):1655-62.
6. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(5):1219.
7. Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. β -Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90(1):493-500.
8. Flower D. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318:1-14.
9. Colantuoni V, Romano V, Bensi G, Santoro C, Costanzo F, Raugei G, et al. Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for human retinol-binding protein. *Nucleic acids research* 1983; 11(22):7769-76.
10. Jaconi S, Rose K, Hughes GJ, Saurat J-H, Siegenthaler G. Characterization of two post-translationally processed forms of human serum retinol-binding protein: altered ratios in chronic renal failure. *Journal of lipid research* 1995; 36(6):1247-53.
11. Newcomer ME, Ong DE. Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 2000;1482(1):57-64.
12. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005;436(7049):356-62.
13. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *New England Journal of Medicine* 2006;354(24):2552-63.
14. Cho YM, Youn B-S, Lee H, Lee N, Min S-S, Kwak SH, et al. Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes care* 2006;29(11):2457-61.
15. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern M, et al. Insulin-sensitive obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2010;299(3):E506-E15.
16. Collins A, Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. *The Open Bioinformatics Journal* 2012;6:55-8.
17. Kovacs P, Geyer M, Berndt J, Klötting N, Graham TE, Böttcher Y, et al. Effects of Genetic Variation in the Human Retinol Binding Protein-4 Gene (RBP4) on Insulin Resistance and Fat Depot-Specific mRNA Expression. *Diabetes* 2007; 56(12):3095-100.
18. Craig RL, Chu WS, Elbein SC. Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Molecular genetics and metabolism* 2007; 90(3):338-44.
19. Murata M, Saito T, Otani T, Sasaki M, Ikoma A, Toyoshima H, et al. An increase in serum retinol-binding protein 4 in the type 2 diabetic subjects with nephropathy. *Endocrine journal* 2009; 56(2):287-94.
20. Von Eynatten M, Lepper P, Liu D, Lang K, Baumann M, Nawroth P, et al. Retinol-binding protein 4 is associated with components of the metabolic syndrome, but not with insulin resistance, in men with type 2 diabetes or coronary artery disease. *Diabetologia* 2007; 50(9):1930-7.
21. Raila J, Henze A, Spranger J, Möhlig M, Pfeiffer A, Schweigert F. Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. *Kidney international* 2007; 72(4):505-11.
22. Harris R, Ukaejiofo E. Tissue Typing Using a Routine One-Step Lymphocyte Separation Procedure. *British journal of haematology* 1970; 18(2):229-36.
23. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research* 2001; 29(17):e88-e.
24. Collins A, Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. *The Open Bioinformatics Journal* 2012;6:55-8.
25. Elbein SC, Hasstedt SJ, Wegner K, Kahn SE. Heritability of Pancreatic β -Cell Function among Nondiabetic Members of Caucasian Familial Type 2 Diabetic Kindreds 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999;84(4):1398-403.
26. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocrine reviews* 1998; 19(4):491-503.
27. Barnett A, Eff C, Leslie RD, Pyke D. Diabetes in identical twins. *Diabetologia* 1981;20(2):87-93.
28. Das SK, Elbein SC. The genetic basis of type 2 diabetes. *Cellscience* 2006; 2(4):100.
29. Maghbooli Z, Hossein-nezhad A, Mirzaei K, Karimi F, Besharati A, Omidfar K, et al.

- Association between retinol-binding protein 4 concentrations and gestational diabetes mellitus and risk of developing metabolic syndrome after pregnancy. *Reproductive Sciences* 2009.
30. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α -and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271(5249):665-70.
 31. Promintzer M, Krebs M, Todoric J, Luger A, Bischof MG, Nowotny P, et al. Insulin resistance is unrelated to circulating retinol binding protein and protein C inhibitor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92(11):4306-12.
 32. Mansouri M, Nikooie R, Keshtkar A, Larijani B, Omidfar K. Effect of endurance training on retinol-binding protein 4 gene expression and its protein level in adipose tissue and the liver in diabetic rats induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Journal of diabetes investigation* 2014; 5(5):484-91.

ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP BETWEEN TWO SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF RBP4 GENES WITH DIABETIC FOOT ULCER IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS REFERRED TO THE CLINIC OF DIABETES & METABOLIC DISEASES

Maryam Mortezaei¹, Abbasali Raz², Shole Mansouri³, Zohreh Annabestani⁴, Zahra Mirzaeezadehe⁵, Bagher Larijani³, Mehrdad Hashemi¹, Kobra Omidfar^{*5}

1. Islamic Azad University, Tehran Medical Branch, Iran

2. Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3. Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Diabetes Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular–Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: Insulin resistance and progressive β -cells failure are the key factors in type 2 diabetes mellitus (T2DM) pathogenesis. Many studies support a primary role of RBP4 in insulin resistance and suggest that genetic variations which alter the expression level of RBP4 might influence the risk of T2DM and its complications. Diabetic foot is one of the main complications of diabetes leading to disability and hospitalization. In addition, it reduces quality of life and imposes great cost to patients. The purpose of this study was to evaluate the correlation between two single nucleotide polymorphisms (rs10882273 and rs10882283) of RBP4 genes with diabetic foot ulcer in order to identify a biomarker for prediction of diabetic foot ulcer.

Methods: This is a case-control study. Two single nucleotide polymorphisms of RBP4 genes were genotyped by hit Tetra ARMS PCR technique. In this study, 100 and 133 diabetic patients with and without foot ulcer were selected as the cases and controls, respectively.

Results: The Chi-square test revealed no significant difference in frequency of TT, CC and TC alleles of rs10882273 between case and control groups ($P=0.414$). Also, Comparison of AA, CC and AC alleles of rs10882283 in both groups did not show significant difference ($P=0.85$).

Conclusion: According to this study, there is no relationship between two single nucleotide polymorphisms of RBP4 genes (rs10882273 and rs10882283) with diabetic foot ulcer in type2 diabetes patients.

Keyword: Type 2 diabetes, Rbp4, Polymorphism, Diabetic foot ulcer

* Shariati Hospital (5th floor), North Kargar Avenue, Endocrinology and Metabolism Research Institute, Tehran, Iran, 1411413137, Phone: +98-21-88220037, email:omidfar@tums.ac.ir