

## Impact of Sex Difference on Interaction between Adiponectin Gene Single Nucleotide Polymorphisms rs2241766, rs17300539 and rs1501299 Environment Risk Factors of Type 2 Diabetes among the Ardabil Population in Iran

Mamashli E<sup>1</sup>, Seifi Skishahr F<sup>1</sup>, Siahkhouhian M<sup>1</sup>, Iranparvar M<sup>2</sup>, Asadi A<sup>3</sup>, Davarnia B \*<sup>4</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Educational Sciences & Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4. Department of Medical Genetics and Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

\* *Corresponding author.* Tel: +984533534680, Fax: +984533534694, E-mail: b.davarnia@gmail.com

Received: Feb 9, 2022 Accepted: Apr 29, 2022

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Sex impacts the manner in which a person responds to such disease as susceptibility and progression. The aim of this study was to investigate the sex differences in the genotype distribution and allele frequency of some of the adiponectin gene polymorphisms and the comparison of the interaction of the studied polymorphisms and type 2 diabetes-related environment risk factors between males and females.

**Methods:** This study included 103 males and 79 females with type 2 diabetes and 94 healthy males and 61 healthy females for control. Genotyping was performed using amplification refractory mutation system-PCR (T-ARMS-PCR). Statistical analysis was done using SPSS-26.0. The interaction between SNP-SNP and SNPs-environmental factors was analyzed using MDR (version 3.0.2) software.

**Results:** Sex-genotype interaction effect was significantly associated only for triglycerides with SNP-11391G/A ( $p=0.027$ ). For SNP+45T/G, the difference genotypes were distinctly associated with hemoglobin A1c ( $p=0.024$ ), body mass index ( $p=0.033$ ) and body fat percentage ( $p=0.018$ ). For +276G/T fasting insulin level detected a potential difference in genotypes ( $p=0.016$ ). Regarding to the results of MDR analysis, the combination of fasting blood glucose, rs17300539 and sex was the best three-factor model. In this model, the distribution of patients according to sex is demonstrated that most men with GA and AA genotypes of -11391G/A had Hemoglobin A1C more than 8.5 while in women there was no relation to genotype found.

**Conclusion:** Sexual difference impact the interaction between adiponectin gene polymorphisms and environmental risk factors. According to the findings of this study, the effect of environmental risk factors on the progression of type 2 diabetes related to Adiponectin gene polymorphisms are demonstrated within the males more than females.

**Keywords:** Adiponectin; Single Nucleotide Polymorphisms; Sexual Difference; Type II Diabetes

# تأثیر تفاوت جنسی بر برهمکنش بین پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن آدیپونکتین rs2241766، rs17300539 و rs1501299 و عوامل خطر محیطی دیابت نوع ۲ در جمعیت اردبیل در ایران

الهه ممشلی<sup>۱</sup>، فرناز سیفی اسگ شهر<sup>۱</sup>، معرفت سیاه کوهیان<sup>۱</sup>، منوچهر ایران پرور<sup>۲</sup>، اسداله اسدی<sup>۳</sup>، بهزاد داورنیا<sup>۴\*</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده روانشناسی و علوم تربیتی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران  
 ۲. گروه پزشکی داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران  
 ۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران  
 ۴. گروه ژنتیک و آسیب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران  
 \* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۸۰ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۹۴ پست الکترونیک: b.davarnia@gmail.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** جنسیت بر واکنش‌های فرد به بیماری‌ها مانند استعداد ابتلا و پیشرفت بیماری مؤثر است. هدف از این مطالعه بررسی تفاوت جنسیتی در توزیع ژنوتایپ و فراوانی آلل برخی از پلی مورفیسم‌های ژن آدیپونکتین و مقایسه برهمکنش پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه و فاکتورهای خطر محیطی مرتبط با دیابت نوع ۲ بین مردان و زنان بود.

**روش کار:** این مطالعه شامل ۱۰۳ مرد و ۷۹ زن مبتلا به دیابت نوع دو و ۹۴ مرد و ۶۱ زن سالم برای کنترل بود. بررسی ژنوتایپی پلی مورفیسم‌ها با استفاده از روش تقویت سیستم مقاوم به جهش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (T-ARMS-PCR) انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از SPSS (نسخه ۲۶) انجام شد. همچنین برهمکنش بین SNP-SNP و SNPs- عوامل محیطی با استفاده از نرم افزار MDR نسخه ۳،۰،۲ تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** اثر متقابل جنس-ژنوتیپ تنها برای تری گلیسیرید با SNP-11391G/A ارتباط معنی‌داری داشت ( $p=0/027$ ). برای rs2241766، تفاوت ژنوتیپ‌ها به‌طور مشخص با هموگلوبین A1c ( $p=0/024$ )، شاخص توده بدنی ( $p=0/033$ ) و درصد چربی بدن ( $p=0/018$ ) مرتبط بود. برای rs1501299 در سطح انسولین ناشتا تفاوت بالقوای در ژنوتیپ‌ها تشخیص داده شد. طبق نتایج تجزیه و تحلیل MDR ترکیب گلوکز ناشتا، rs17300539 (G/A -11391) و جنسیت بهترین مدل سه عاملی بود. در این مدل توزیع بیماران به تفکیک جنسیت نشان داد اکثر مردان دارنده ژنوتایپ‌های GA و AA از rs17300539 -11391 هموگلوبین A1C بیشتر از ۸/۵ داشتند در حالی که در زنان هیچ ارتباطی با ژنوتیپ یافت نشد.

**نتیجه‌گیری:** تفاوت‌های جنسی بر تعامل بین پلی مورفیسم‌های ژن آدیپونکتین و عوامل خطر محیطی تأثیر می‌گذارد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، تأثیر عوامل خطر محیطی بر پیشرفت دیابت نوع ۲ مرتبط با پلی مورفیسم‌های ژن آدیپونکتین در مردان بیش از زنان نشان داده شده است.

**واژه‌های کلیدی:** آدیپونکتین، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، تفاوت جنسی، دیابت نوع دو

دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱۹

## مقدمه

دیابت نوع ۲ (T2D) یکی از عوامل اصلی مرگ و میر زنان و مردان در جهان است. زنگ خطر دیابت چند سالی است که به صدا درآمده است. تقریباً ۵۳۷ میلیون بزرگسال (۲۰ تا ۷۹ سال)، مبتلا به دیابت هستند. طبق دهمین ویرایش گزارش فدراسیون بین‌المللی دیابت در سال ۲۰۲۱، تعداد افراد مبتلا به دیابت تا سال ۲۰۳۰ به ۶۴۳ میلیون نفر و تا سال ۲۰۴۵ به ۷۸۳ میلیون نفر خواهد رسید (۱). شیوع تخمینی دیابت در مردان بیشتر از زنان است. طبق آمار بدست‌آمده در سال ۲۰۲۱ تعداد مردان مبتلا به T2D ۱۷/۷ میلیون نفر بیشتر از زنان مبتلا است (۱). T2D یک بیماری پیچیده شایع با الگوی توارث چند عاملی است. بنابراین چندین ژن می‌توانند بروز و پیشرفت دیابت را در تعامل با یکدیگر کنترل کنند. تاکنون چندین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی شناسایی شده‌اند که با خطر بروز و پیشرفت دیابت نوع دو در جمعیت‌های مختلف مرتبط بوده‌اند، یکی از ژن‌هایی که نتایج قابل توجهی در تعیین مبانی ژنتیکی ابتلا به T2D داشته است ژن آدیپونکتین می‌باشد (۲، ۳). از این رو، در سال‌های اخیر آدیپونکتین به عنوان یک هدف درمانی بالقوه برای T2D مورد توجه قرار گرفته است. آدیپونکتین توسط ژن APM1 (ADIPOQ) کدگذاری می‌شود که روی کروموزوم ۲۷q۳ قرار گرفته است. این ناحیه، لوکوس مرتبط با دیابت نامگذاری می‌شود (۴). در سال‌های اخیر گزارشات زیادی از تأثیر پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن آدیپونکتین بر استعداد ابتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیت‌های مختلف منتشر شده است. در این پژوهش‌ها برخی از این پلی‌مورفیسم‌ها با افزایش خطر ابتلا به دیابت نوع دو مرتبط بوده‌اند. اما نتایج بررسی در جمعیت‌های مختلف ضد و نقیض است. فومرون و همکاران در یک مطالعه آینده‌نگر به بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم‌های آدیپونکتین بر عوامل توسعه سندروم مقاومت به انسولین در ۴۵۰۰

فرانسوی قفقازی پرداختند که طبق یافته‌های این پژوهش در rs2241766(SNP+۴۵T/G) حاملین ژنوتایپ GG نسبت به حاملین سایر ژنوتایپ‌ها بیشتر در معرض خطر افزایش قند خون و وزن بدن بودند (۵). همچنین برای SNP-۱۱۳۹۱ G/A (rs17300539) حاملین ژنوتایپ GA نسبت به سایر ژنوتایپ‌ها خطر بیشتری برای ابتلا به دیابت نوع دو نشان دادند، در حالی که در پژوهش صورت گرفته توسط نلسون و همکاران نشان داده شد تغییرات سطوح آدیپونکتین در زنان و مردان سالم بعد از یک دوره مکمل‌دهی با آلفا لینولنیک اسید مستقل از پلی‌مورفیسم‌های rs2241766(SNP+G/T۲۷۶) و rs1501299 است (۶). آنتونوپلوس و همکاران در مطالعه‌ای بر روی یونانیان، گزارش کردند که حاملین ژنوتایپ TT از SNP+۲۷۶ G/T سطوح پلاسمایی آدیپونکتین پایین‌تری نسبت به حاملین ژنوتایپ GG دارند و به طور مستقل این ژنوتایپ در این جمعیت، عامل موثری در افزایش خطر انفارکتوس میوکارد به شمار می‌رود (۷). به طور معکوس، یافته‌های مطالعه‌ی دیگری بر روی مردان و زنان ایتالیایی نشان داد در SNP+۲۷۶ G/T ژنوتایپ TT باعث کاهش خطر انفارکتوس میوکارد و دیابت نوع دو می‌شود (۸). همچنین در این مطالعه SNP+۴۵T/G و SNP-۱۱۳۹۱ اثر قابل توجهی نشان ندادند. حدوداً ۹۰ درصد از شرکت‌کنندگان این پژوهش مردان بودند. قابل ذکر است که در هیچ یک از پژوهش‌های ذکر شده اثر جنسیت مورد توجه و ارزیابی قرار نگرفته است.

مردان و زنان از نظر جنسی دوشکلی هستند، دوشکلی جنسی وضعیتی است که در آن جنس‌های یک گونه ویژگی‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند، به ویژه ویژگی‌هایی که اثر مستقیمی در تولیدمثل ندارند. دوشکلی جنسی می‌تواند خطر بروز و پیشرفت بیماری‌ها را نیز تحت تأثیر قرار دهد (۹). مطالعات گذشته نشان داده‌اند بین دو جنس مرد و زن تفاوت-

هایی در خطر ابتلا و پیشرفت T2D وجود دارد (۱۰). به طوری که دیابت در مردان با سن و شاخص توده بدن کمتر نسبت به زنان، بیشتر تشخیص داده شده است، همچنین زنان دارای سطوح آدیپونکتین بالاتری نسبت به مردان با سن و شاخص توده بدن مشابه هستند که ممکن است با هورمون‌های جنسی آن‌ها مرتبط باشد (۱۱). تاکنون در هیچ مطالعه‌ای ارتباط پلی‌مورفیسیم‌های ژن آدیپونکتین با عوامل خطر محیطی T2D با در نظر گرفتن جنسیت مورد بررسی قرار نگرفته است. هرچند تفاوت بروز و پیشرفت یک بیماری بین دو جنس می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی از جمله سبک زندگی قرار بگیرد اما به نظر می‌رسد عوامل ژنتیکی در بروز این تفاوت‌ها سهم قابل توجهی داشته باشد. در واقع با بررسی دلایل بروز این چنین تفاوت‌هایی بین مردان و زنان می‌توان رویکردهای پیشگیری و درمان را برای هر جنس به طور هدفمند دنبال کرد.

هدف از این مطالعه بررسی تفاوت در توزیع ژنوتایپ و فراوانی آلل ۳ پلی‌مورفیسیم ژن آدیپونکتین بین مردان و زنان سالم و بیمار و سپس مقایسه برهمکنش پلی‌مورفیسیم‌های مورد مطالعه و فاکتورهای خطر محیطی مرتبط با دیابت نوع ۲ بین مردان و زنان مبتلا به دیابت نوع دو بود.

## روش کار

### طراحی مطالعه و شرکت‌کنندگان

پژوهش حاضر از نوع موردی-شاهدی است و کلیه افراد مبتلا به T2D و سالم ۴۵ تا ۶۵ سال که از بدو تولد در شهرستان اردبیل زندگی می‌کردند جامعه آماری این پژوهش را تشکیل می‌دادند. ۷۹ زن و ۱۰۳ مرد مبتلا به T2D (که در ۶ ماه اول سال ۱۳۹۹ به کلینیک غدد بیمارستان امام اردبیل مراجعه کرده بودند) به عنوان گروه بیماران و ۹۴ مرد و ۶۱ زن سالم (که برای درمان سرپایی و معاینات فیزیکی به بیمارستان مذکور مراجعه کرده بودند) به عنوان

گروه کنترل، نمونه آماری پژوهش حاضر را تشکیل دادند. معیارهای ورود به مطالعه شامل داشتن نژاد قفقازی<sup>۱</sup>، زندگی کردن از بدو تولد در شهر اردبیل و سن کمتر از ۶۵ سال برای تمامی شرکت‌کنندگان و سابقه ابتلا به T2D بیش از ۱۰ سال فقط برای گروه بیماران بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل هرگونه ارتباط فامیلی بین افراد برای کلیه شرکت‌کنندگان و داشتن اختلال تحمل گلوکز و داشتن سابقه خانوادگی ابتلا به دیابت نوع دو فقط برای افراد سالم بود. همه شرکت‌کنندگان از طریق پرسشنامه سلامت و فعالیت بدنی روزانه (۱۳) همگن سازی شدند و قبل از جمع‌آوری داده‌ها فرم رضایت آگاهانه را تکمیل و تایید کردند. داده‌ها طی دو جلسه جمع‌آوری شدند. در جلسه اول اطلاعات جمعیت شناختی و تن‌سنجی شرکت‌کنندگان جمع‌آوری شد. اطلاعات جمعیت شناختی شامل سن، جنسیت، سن ابتلا و سابقه خانوادگی ابتلا به T2D بود. شاخص‌های تن‌سنجی شامل قد، وزن و شاخص توده بدن بود. قد و وزن به وسیله دستگاه قد و وزن‌سنج مدل سکا (and Seca 284, Medical Measuring Systems Scales since 1840, Germany) اندازه‌گیری شد. شاخص توده بدن از طرق فرمول مربوطه محاسبه شد [قد به توان ۲ (متر) / وزن (کیلوگرم)]. در جلسه دوم، نمونه‌گیری خونی انجام شد.

تاییدیه اخلاق برای پژوهش حاضر از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به شماره (IR.ARUMS.REC.1397.287) اخذ شد.

<sup>۱</sup> نژاد قفقازی (Caucasian race) متشکل از ساکنان بومی اروپا، غرب آسیا، شبه‌جزیره هند و شمال آفریقا تعریف می‌شود. در انسان‌شناسی بیولوژیکی، قفقازی (Caucasoid) به عنوان یک اصطلاح چتر برای گروه‌های مشابه فنوتیپی از این مناطق مختلف، با تمرکز بر آناتومی اسکلتی و به ویژه مورفولوژی جمجمه، بدون توجه به رنگ پوست استفاده شده است (۱۲).

**نمونه‌گیری خون و اندازه‌گیری فاکتورهای خونی**

نمونه‌گیری خونی پس از یک شب ناشتایی و با پرهیز از مصرف دارو (در صبح روز نمونه‌گیری خون) انجام شد. نمونه‌های خون در دو لوله جداگانه، یکی حاوی ضد انعقاد EDTA (برای استخراج DNA و اندازه‌گیری HbA1c) و دیگری بدون ضد انعقاد (برای سایر فاکتورهای خونی) جمع‌آوری شد. همه نمونه‌ها بلافاصله روی یخ قرار گرفتند و لوله‌های بدون ضد انعقاد بلافاصله به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند. کلسترول تام (TC)، تری‌گلیسیرید (TG)، لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) و لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) به صورت آنزیمی (پارس‌آزمون، تهران، ایران) اندازه‌گیری شدند. میزان قند خون ناشتا (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) با استفاده از کیت (پارس‌آزمون، تهران، ایران) و هموگلوبین گلیکولیزه (HbA1c) با کیت (پادکو، تهران، ایران) اندازه‌گیری شدند، کل فاکتورهای خونی در هر روش استاندارد در آزمایشگاه تشخیصی بیمارستان امام اردبیل اندازه‌گیری شد.

**استخراج DNA و ارزیابی ژنتیکی**

آنالیز مولکولی و بررسی ژنوتایی پلی‌مورفیسم‌ها با استفاده از روش تقویت سیستم مقاوم به جهش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (T-ARMS-PCR) که اخیراً توسط حسین و همکاران (۱۴) شرح داده شده است، انجام شد. استخراج DNA از نفوسیت‌های خون محیطی با استفاده از روش استاندارد رسوب‌دهی نمک<sup>۱</sup> که توسط میلر و همکاران (۱۵) معرفی شده است، انجام شد. از بافر TE (Tris+EDTA) برای حل کردن DNA استفاده شد. تعیین خلوص، غلظت و کیفیت DNA ژنومی با استفاده از اسپکتروفتومتری

<sup>۱</sup> Salting Out

مرئی - فرابنفش (Microvolume NanoDrop OneC UV-Vis Spectrophotometer; ThermoFisher Scientific, USA) با نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار طراحی پرایمر آنلاین (Primer3. 4.1.0) طراحی شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. توالی هدف برای هر پلی‌مورفیسم با استفاده از یک ترموسایکلر (Bio Rad- T100 PCR thermal cycler) (USA) از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)، با حجم کلی ۲۰ میکرولیتر (شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (PCR Master Mix, 2X, SinaClon, Iran)، ۷ میکرولیتر آب مقطر بدون نوکلئاز، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ pmol و ۱ میکرولیتر از الگو (با میانگین غلظت ۲۵۰ ng/μL) تکثیر شد. برنامه چرخه ترموسایکلر برای سه SNPs به شرح زیر بود، (واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر به DNA به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه (دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد برای rs17300539، دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای rs2241766، بسط ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه). بررسی اندازه باند محصولات تکثیر شده PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲ درصد که با سیف استین رنگ‌آمیزی شده بود انجام شد که با نور ماوراء بنفش (UV) آشکارسازی و مشاهده شدند. پهنای باند محصول PCR تکثیر شده با یک لدر استاندارد مقایسه شد و ژنوتایپ هر نمونه برای هر یک پلی‌مورفیسم‌ها ثبت شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرها مورد استفاده در PCR برای تکثیر SNPها (rs17300539, rs2241766, rs1501299)

اندازه باند	توالی پرایمر	آلل (غالب / مغلوب)	موقعیت عملکردی	موقعیت کروموزوم	نام ژن	کد شناسایی پلی مورفیسم
۲۸۳ ۱۲۵ ۲۱۹	OF=5'-AATGGTGGACTTGACTTTAC-3' IF=5'-GTGTGGCTTGCTAGAATCG-3' IR=5'-GAAGGGCAGGATCTGTGCT-3' OR=5'-TTAGGCTTGAAGTGGCAAC-3'	- 11391 G/A	پروموتور	3q27.3(186841671)	ADIPOQ	rs17300539
۲۸۳ ۲۹۲ ۱۵۳	OF=5'-AATGGTGGACTTGACTTTAC-3' IF=5'-TGCTATTAGCTCTGCCAGT-3' IR=5'-TCGTGGTTTCTGGTCAAGC-3' OR=5'-TTAGGCTTGAAGTGGCAAC-3'	+45 T/G	اگزون ۲	3q27.3(186841671)	ADIPOQ	rs2241766
۳۴۹ ۱۴۲ ۲۵۰	OF=5'-ATGACCAGGAAACCACGACT-3' IF=5'-CACTGATATAAACTATATGGAGG-3' IR=5'-GCCTTAGTTAATGACTGA-3' OR=5'-AGAGGCACCATCTACTCA-3'	+276 G/T	اینترن ۲	3q27.3(186841671)	ADIPOQ	rs1501299

### تحلیل آماری

از آزمون کای اسکوئر<sup>۱</sup> ( $\chi^2$ ) برای بررسی تفاوت در توزیع ژنوتیپ و فراوانی آلل هر پلی مورفیسم بین زنان و مردان به تفکیک در گروه‌های مورد و شاهد استفاده شد. برای مقایسه تفاوت‌های بین گروهی ویژگی‌های پایه، از آزمون t مستقل، کای اسکوئر و یو من- ویتنی در جای مناسب آن استفاده شد. برای بررسی اثر دو متغیر مستقل (ژنوتایپ و جنسیت) بر متغیرهای وابسته از آزمون آنووا دوطرفه<sup>۲</sup> استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-26 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین ارزیابی برهمکنش بین SNP-SNP و SNPs- عوامل محیطی برای پیش‌بینی پیشرفت بیماری از طریق نرم‌افزار تجزیه و تحلیل کاهش ابعاد چند عاملی (MDR<sup>۳</sup>) انجام شد.

### تجزیه و تحلیل کاهش ابعاد چند عاملی (MDR)

برهمکنش بین SNP-SNP و SNPs- عوامل محیطی با استفاده از نرم افزار MDR نسخه ۳.۰.۲ تجزیه و تحلیل شد. روش MDR یک روش آماری ناپارامتریک است که برهمکنش‌های غیرخطی بین فاکتورهای خطر محیطی و SNPs را برای پیش‌بینی استعداد ابتلا و یا پیشرفت بیماری تشخیص می‌دهد، به

طوری که بر اساس دو شاخص حداکثر ثبات اعتبار متقابل (CVC<sup>۴</sup>) و دقت تعادل آزمون (TBA<sup>۵</sup>) بهترین مدل (ترکیبی از SNPs و عوامل محیطی) برای پیش‌بینی استعداد ابتلا و یا پیشرفت بیماری را انتخاب می‌کند. برای مثال وقتی که در این روش ابتلا به بیماری به عنوان معیار برای ارزیابی برهمکنش بین متغیرها قرار می‌گیرد ابتلا به بیماری با (۱) و عدم ابتلا به بیماری با (۰) کدگذاری می‌شود. سپس نرم افزار، متغیرهایی که بیشترین برهمکنش را باهم دارند (چه به صورت خطی و یا غیر خطی) تا در کنار هم بتوانند بیشترین شانس را برای ابتلا به بیماری یا نائل شدن به معیار بر اساس دو شاخص CVC و TBA داشته باشند به صورت مدل ترکیبی معرفی می‌کند. MDR برای غلبه بر محدودیت‌هایی که در روش‌های پارامتریک (مانند محدودیت‌های اندازه نمونه در رگرسیون لجستیک) ممکن است با آن مواجه شد، جایگزین خوبی است (۱۶). برای جلوگیری از مثبت کاذب در محاسبه شاخص دقت تعادل آزمون، انتخاب اعداد تصادفی را ۱۰ بار و برای جلوگیری از مثبت کاذب در محاسبه شاخص ثبات اعتبار متقابل متغیرها، روش اعتبارسنجی متقابل روی ۱۰ بار تنظیم شد. برای پیش‌بینی معیار تعیین شده (در این پژوهش معیار برای پیش‌بینی پیشرفت بیماری بر

<sup>4</sup> Cross Validation Consistency

<sup>5</sup> Testing Balance Accuracy

<sup>1</sup> Chi-Square

<sup>2</sup> Tow Way ANOVA

<sup>3</sup> Multifactor Dimensionality Reduction

از مقادیر تکراری است. مقادیر مثبت نشان‌دهنده تعامل هم‌افزایی است. رنگ خطوط اتصال‌دهنده درجه‌های هم‌افزایی و حشو را مشخص می‌کند، خطوط آبی نشان‌دهنده درجه بالایی از حشو، خطوط سبز نشان‌دهنده درجه کاهش‌یافته حشو، رنگ نارنجی نشان‌دهنده درجه متوسطی از تعامل هم‌افزایی و رنگ طلایی نشان‌دهنده درجه حد متوسط بین حشو و هم‌افزایی است.

### یافته‌ها

ویژگی‌های پایه مربوط به زنان و مردان به تفکیک در هر گروه و مقایسه بین آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. از نظر داده‌های جمعیت شناختی و فاکتورهای خونی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین زنان و مردان در هیچ یک از دو گروه مشاهده نشد. اما در داده‌های تن‌سنجی، قد و وزن بین زنان و مردان هم در گروه بیماران و هم در گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

اساس میزان HbA1C در نظر گرفته شد به این صورت که HbA1C بیشتر از ۸/۵ با کد (۱) و HbA1C کمتر از ۸/۵ با کد (۰) (کدگذاری شد) ممکن است میزانی آنتروپی در دستیابی به معیار ایجاد شود که هر متغیر بر اساس ماهیت و اثر خود میزانی از این آنتروپی را حذف می‌کند تا تعامل هم‌افزا با سایر متغیرها را بالا ببرد. در حقیقت آنتروپی برهم‌ریختگی برهمکنش بین فاکتورها است و اثر تعاملی را برای پیش‌بینی معیار کاهش می‌دهد. برای این منظور نمودارهای آنتروپی بر اساس نتایج MDR برای اینکه چشم‌انداز واضح‌تر و نمایش بهتر برهمکنش‌ها ارائه شود ترسیم شده است. این نمودار از تعدادی سلول تشکیل شده است که با خط‌هایی به هم متصل شده‌اند. اثر مستقل هر متغیر در داخل هر سلول نشان داده شده است و این عدد در واقع درصد آنتروپی حذف شده توسط آن متغیر است. در نمودار آنتروپی اثر متقابل متغیرها به شکل مقادیر مشخص شده بر روی خطوط اتصال‌دهنده دو متغیر نشان داده شده است. مقادیر منفی نشان‌دهنده افزونگی یا حشو ناشی

جدول ۲. ویژگی‌های پایه افراد مورد مطالعه

P value	زنان سالم	مردان سالم	P value	زنان بیمار	مردان بیمار	متغیر
--	۶۱ (۳۹/۴٪)	۹۴ (۶۰/۶٪)	--	۷۹ (۴۳/٪۴)	۱۰۳ (۵۶/۶٪)	تعداد نمونه
۰/۱۰۷	۵۴/۳۸ ± ۵/۹	۵۵/۹ ± ۵/۶۱	۰/۹۲۳	۵۶/۳۵ ± ۵/۵	۵۶/۴۴ ± ۵/۸	سن (سال)
--	--	--	۰/۶۹	۱۷/۲۲ ± ۳/۴	۱۷/۴۳ ± ۳/۸	سابقه ابتلا به دیابت (سال)
۰/۰۰۱*	۱۶۲/۳۱ ± ۷/۸	۱۷۲/۱۱ ± ۶/۷	۰/۰۰۱*	۱۶۰/۹۷ ± ۷/۶	۱۶۹/۶۰ ± ۷/۸	قد (سانتی متر)
۰/۰۰۱*	۷۸/۳۶ ± ۱۱/۲۹	۸۲/۳۸ ± ۱۱/۰۶	۰/۰۳۸*	۷۵/۸۴ ± ۱۰/۵	۷۹/۰۹ ± ۱۰/۲	وزن (کیلوگرم)
۰/۴۷۵	۲۸/۱۶ ± ۳/۲۴	۲۷/۷۸ ± ۳/۲۱	۰/۰۰۱*	۲۹/۲۴ ± ۳/۲۵	۲۷/۴۷ ± ۲/۸۵	شاخص توده بدن (کیلوگرم بر مترمربع)
۰/۲۴۰	۸۷/۵۳ ± ۹/۸۶	۸۵/۶۷ ± ۹/۲۰	۰/۱۰۲	۲۱۵/۱۲ ± ۴۸/۳۵	۲۲۷/۷۸ ± ۵۵/۴	گلوکز ناشتا (میلی گرم/دسی لیتر)
۰/۰۷۵	۵/۴۲ ± ۰/۳۰	۵/۳۴ ± ۰/۲۸	۰/۸۷۶	۹/۳۱ ± ۱/۳۹	۹/۳۴ ± ۱/۴۷	هموگلوبین A1C (درصد)
۰/۵۴۴	۵/۳۱ ± ۰/۴۹	۵/۲۷ ± ۰/۴۵	۰/۲۶۱	۸/۳۷ ± ۱/۳۰	۸/۵۹ ± ۱/۴۰	انسولین ناشتا (میکروواحد/میلی لیتر)
۰/۱۵۴	۱۷۷/۱۸ ± ۴۱/۸	۱۸۷/۰۱ ± ۴۱/۷	۰/۶۱۹	۱۸۱/۶۵ ± ۳۸/۵۸	۱۸۲/۰۵ ± ۳۹/۸	کلسترول تام (میلی گرم/دسی لیتر)
۰/۰۶۰	۱۷۶/۳۴ ± ۷۳/۶	۲۰۰/۵ ± ۸۲/۲۱	۰/۶۵۳	۱۹۱/۷۲ ± ۷۹/۸۰	۱۸۶/۴۶ ± ۷۶/۷	تری‌گلیسرید (میلی گرم/دسی لیتر)
۰/۱۴۸	۳۷/۹۵ ± ۶/۶۳	۳۶/۴۳ ± ۶/۱۶	۰/۶۸۲	۳۶/۷۵ ± ۸/۴۱	۳۶/۷۸ ± ۷/۶۷	لیپوپروتئین پر چگالی (میلی گرم/دسی لیتر)
۰/۴۴۳	۱۰۴/۶۴ ± ۲۷/۷	۱۰۸/۵۳ ± ۳۴/۸	۰/۶۶۳	۱۰۵/۸۵ ± ۳۰/۹۰	۱۰۶/۰۶ ± ۲۸/۵	لیپوپروتئین پر چگالی (میلی گرم/دسی لیتر)

\*p value: از طریق آزمون‌های کای اسکوئر، تی مستقل یا یو من ویتنی با توجه به شرایط محاسبه شده است.

**تبادل هاردی - واینبرگ**

ژنوتیپ‌های مشاهده شده همه پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه در گروه کنترل با ژنوتایپ‌های مورد انتظار در تبادل هاردی واینبرگ مطابقت داشت ( $p \geq 0.05$ ).

**تجزیه و تحلیل توزیع ژنوتایپ و فراوانی آلل بین دو گروه بیمار و کنترل به تفکیک جنسیت**

جدول ۳ توزیع ژنتیکی سه پلی‌مورفیسم مورد مطالعه را در دو گروه به تفکیک جنسیت نشان می‌دهد. در SNP+ $\epsilon\delta T/G$  فقط بین زنان گروه کنترل و بیمار

اختلاف معنی‌داری در توزیع ژنوتایپ ( $p=0.027$ ) و فراوانی آلل ( $p=0.10$ ) مشاهده شد. توزیع ژنوتایپ ( $p=0.024$ ) و فراوانی آلل ( $p=0.007$ ) در G/A SNP-11391 فقط بین مردان سالم و بیمار اختلاف معنی‌داری را نشان داد. جدول ۳ همچنین حاوی یافته‌های مربوط به بررسی اختلاف توزیع ژنوتایپ و فراوانی آلل بین مردان و زنان بیمار است. توزیع ژنوتایپ و فراوانی آلل بین مردان و زنان بیمار در هیچ یک از پلی‌مورفیسم‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت.

جدول ۳. تفاوت توزیع ژنوتایپ و آلل پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه در گروه بیمار و کنترل به تفکیک جنسیت

پلی مورفیسم	ژنوتایپ / آلل	زنان گروه کنترل (۶۱)	زنان گروه بیمار (۷۹)	P-value*	مردان گروه کنترل (۹۴)	مردان گروه بیمار (۱۰۳)	P value**	P value†
rs2241766 (+45 T/G)	TT	۴۹ (۸۰/۳٪)	۴۷ (۵۸/۴٪)	0.027*	۷۰ (۷۴/۵٪)	۶۶ (۶۴/۱٪)	0.118	0.21
	TG	۱۱ (۱۸٪)	۲۷ (۳۴/۳٪)		۲۰ (۲۱/۳٪)	۲۵ (۲۴/۳٪)		
	GG	۱ (۱/۶٪)	۵ (۶/۳٪)		۴ (۴/۳٪)	۱۲ (۱۱/۷٪)		
rs1501299 (+276 G/T)	T allele	۱۰۹	۱۲۱	0.10*	۱۶۰	۱۵۷	0.077	0.54
	G allele	۱۳	۳۷		۲۸	۴۹		
	GG	۴۰ (۶۵/۶٪)	۵۱ (۶۴/۶٪)		۵۳ (۵۶/۴٪)	۶۶ (۶۴/۱٪)		
rs17300539 (-11391 G/A)	GT	۱۹ (۳۱/۱٪)	۲۵ (۳۱/۶٪)	0.983	۳۵ (۳۷/۲٪)	۳۴ (۳۳/۰٪)	0.343	0.926
	TT	۲ (۳/۳٪)	۳ (۳/۸٪)		۶ (۶/۴٪)	۳ (۲/۹٪)		
	G allele	۹۹	۱۲۷		۱۴۱	۱۶۶		
rs17300539 (-11391 G/A)	T allele	۲۳	۳۱	0.522	۴۷	۴۰	0.169	0.536
	GG	۵۲ (۸۵/۲٪)	۶۴ (۸۱٪)		۸۱ (۸۶/۲٪)	۷۳ (۷۰/۹٪)		
	GA	۸ (۱۳/۱٪)	۱۱ (۱۳/۹٪)		۱۱ (۱۱/۷٪)	۲۸ (۲۷/۲٪)		
rs17300539 (-11391 G/A)	AA	۱ (۱/۶٪)	۴ (۵/۱٪)	0.543	۲ (۲/۱٪)	۲ (۱/۹٪)	0.024**	0.061
	G allele	۱۱۲	۱۳۹		۱۷۳	۱۷۴		
	A allele	۱۰	۱۹		۱۵	۳۲		

\*p value: از طریق آزمون‌های کای اسکور یا آزمون دقیق فیشر برای بررسی اختلاف بین زنان سالم و بیمار محاسبه شده است.

\*\*p value: از طریق آزمون‌های کای اسکور یا آزمون دقیق فیشر برای بررسی اختلاف بین مردان سالم و بیمار محاسبه شده است.

†p value: از طریق آزمون‌های کای اسکور یا آزمون دقیق فیشر برای بررسی اختلاف بین زنان و مردان بیمار محاسبه شده است.

**نتایج آزمون آنالیز واریانس دو طرفه چند متغیره**

اثر تعاملی ژنوتایپ-جنسیت فقط در SNP-11391 G/A برای متغیر تری‌گلیسرید معنی‌دار بود ( $p=0.027$ ) که آزمون تعقیبی نشان داد در گروه زنان، تری‌گلیسرید در حاملین ژنوتایپ GG به طور معنی‌داری از حاملین سایر ژنوتایپ‌ها کمتر بود. در  $\epsilon\delta T/G$  + اختلاف بین ژنوتیپ‌ها برای سه متغیر

هموگلوبین A1C ( $p=0.024$ )، شاخص توده بدن ( $p=0.033$ ) و درصد چربی بدن ( $p=0.018$ ) معنی‌دار بود، آزمون تعقیبی برای متغیر هموگلوبین A1C اختلاف را بین ژنوتایپ‌های TT و TG با کم‌تر بودن هموگلوبین A1C در ژنوتایپ TT نسبت به GG نشان داد ( $p=0.014$ )، اما در مورد متغیرهای شاخص توده بدن و درصد چربی بدن مقادیر در حاملین



درصد چربی بدن بین دو گروه مردان و زنان بدون در نظر گرفتن ژنوتیپ اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $p=0/001$ ). کلیه موارد ذکر شده در مورد نتایج آزمون آنالیز واریانس دوطرفه در جدول ۴ ارائه شده است.

ژنوتایپ GG به طور معنی‌داری کمتر از TT بود (به ترتیب  $p=0/019$ ,  $p=0/049$ ). در  $276G/T$  + انسولین ناشتا اختلاف معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌ها نشان داد ( $p=0/016$ ) که طبق نتایج آزمون تعقیبی اختلاف بین ژنوتیپ‌های GG و GT با کمتر بودن سطوح این متغیر در ژنوتیپ GG معنی‌دار بود ( $p=0/013$ ). متغیر

جدول ۴. نتایج آزمون آنالیز واریانس دو طرفه برای بررسی تعامل بین ژنوتیپ و گروه‌ها

متغیر	گروه	ژنوتایپ (SNP+45 T/G)			P-value* (effect size)			اثر متقابل گروه و ژنوتایپ	اثر اصلی جنسیت	اثر اصلی ژنوتایپ	مقیاسه‌های زوجی
		GG	TG	TT	اثر اصلی	اثر متقابل	اثر متقابل				
هموگلوبین A1c	مردان	9/90 ± 1/28	9/60 ± 1/51	9/14 ± 1/46	0/828	0/786	0/24*	0/001	0/422	0/001	1 & 2
	زنان	9/63 ± 1/71	9/74 ± 1/34	9/02 ± 1/34	0/02	0/001	0/422				
شاخص توده بدن	مردان	26/82 ± 2/30	27/04 ± 2/66	27/74 ± 3/02	0/377	0/070	0/33*	0/019	0/38	0/019	1 & 3
	زنان	27/94 ± 2/70	28/93 ± 2/95	30/09 ± 3/03	0/011	0/019	0/38				
درصد چربی بدن	مردان	27/82 ± 4/42	26/57 ± 3/27	28/61 ± 2/66	0/319	0/001*	0/18*	0/013	0/349	0/310	1 & 2
	زنان	30/88 ± 2/51	32/76 ± 4/92	32/93 ± 3/33	0/013	0/349	0/310				
تری‌گلیسرید	مردان	251/6 ± 97/5	187/5 ± 83/4	190/7 ± 73/3	0/027*	0/561	0/675	0/002	0/004	0/004	1 & 3
	زنان	194/5 ± 50/1	233/2 ± 63/3	187/2 ± 79/4	0/40	0/002	0/004				
درصد چربی بدن	مردان	29/60 ± 1/03	27/63 ± 3/69	28/13 ± 2/95	0/064	0/001*	0/668	0/951	0/005	0/005	1 & 2
	زنان	32/05 ± 3/9	33/6 ± 4/7	32/4 ± 3/89	0/038	0/951	0/005				
انسولین	مردان	9/67 ± 0/89	9/075 ± 1/43	8/30 ± 1/33	0/501	0/253	0/16*	0/007	0/46	0/46	1 & 3
	زنان	8/89 ± 1/43	8/55 ± 1/03	8/24 ± 1/41	0/008	0/007	0/46				
درصد چربی بدن	مردان	27/19 ± 3/81	27/62 ± 6/10	27/98 ± 5/58	0/466	0/001*	0/409	0/581	0/10	0/10	1 & 2
	زنان	44/44 ± 9/54	38/82 ± 9/39	40/79 ± 5/23	0/009	0/581	0/10				

\*P value: از طریق آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه چند متغیره محاسبه شده است. P-value در اثر اصلی ژنوتایپ، سطح معنی‌داری تفاوت بین سه گروه ژنوتایپ هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته، را نشان می‌دهد. P-value در اثر اصلی گروه، سطح معنی‌داری تفاوت بین گروه مردان و زنان را نشان می‌دهد. P-value در اثر متقابل ژنوتیپ - جنسیت سطح معنی‌داری در برهمکنش بین ژنوتیپ‌ها با جنسیت را نشان می‌دهد. P-value سطح معنی‌داری در مقایسه‌های زوجی مربوط به آزمون تعقیبی را نشان می‌دهد.

### نتایج تجزیه و تحلیل MDR

نتایج تجزیه و تحلیل MDR در جدول ۵ ارائه شده است. معیار برای عدم کنترل مناسب بیماری و یا پیشرفت بیماری، هموگلوبین A1C بیشتر از ۸/۵ قرار داده شد، به این صورت که شرکت‌کنندگان به دو گروه، افراد با هموگلوبین A1C کمتر از ۸/۵ و افراد با هموگلوبین A1C بیشتر از ۸/۵ دسته‌بندی شدند. این جدول شامل چهار مدل منتخب است به طوری که که متغیرهایی که بیشترین تعامل برای پیش‌بینی عدم کنترل بیماری T2D را با هم داشتند به‌عنوان بهترین مدل‌های پیش‌بینی‌کننده انتخاب شدند. در جدول ۷،

گلوکز ناشتا بهترین مدل تک عاملی با CVC برابر ۱۰/۱۰ و دقت تعادل آزمون ۰/۸۱۳۸ بود که عدم کنترل بیماری را پیش‌بینی می‌کرد ( $p<0/001$ ). ترکیب گلوکز ناشتا و کلسترول تام بهترین مدل دو عاملی، گلوکز ناشتا، rs17300539 و جنسیت بهترین مدل سه عاملی، و بهترین مدل چهار عاملی شامل گلوکز ناشتا، چربی بدن، rs17300539، جنسیت بود.

### نمودار آنتروپی تعامل

نمودار ۱ آنتروپی تعامل بین متغیرها را نشان می‌دهد. در این نمودار مشاهده می‌شود گلوکز ناشتا با ۳۲/۱۳ درصد یک اثر مستقل قوی برای حذف

آنتروپی دارد، پلی مورفیسم rs17300539 /۵۵/۰ درصد از آنتروپی را حذف می‌کند. همچنین درصد چربی بدن و جنسیت هم به ترتیب ۰/۸۱ درصد و ۰/۰۹ درصد از آنتروپی را حذف می‌کنند. کلاسترول ۳/۵۶ درصد از آنتروپی را حذف می‌کند و در تعامل هم افزای قوی با جنسیت است. rs17300539 و درصد چربی بدن ۰/۳۲ درصد هم افزایی برای پیش‌بینی پیشرفت بیماری دارند.

#### نمودار ستونی

نمودار ۲ جزئیات توزیع متغیرها در مدل سه عاملی را نشان می‌دهد، که در آن نحوه تعامل متغیرها برای پیش‌بینی عدم کنترل بیماری به خوبی تصویرسازی شده است. در این نمودار برای rs17300539 (۱۱۳۹۱ G/A-)، ۱ نشان‌دهنده GG، ۲ نشان‌دهنده GA و ۳ نشان‌دهنده AA است. برای گلوکز ناشتا، ۱ نشان‌دهنده مقادیر کمتر از ۲۱۲/۳، و کد ۲ نشان‌دهنده مقادیر بین ۲۱۲/۳ تا ۲۸۶/۶ همچنین کد ۳ نشان‌دهنده مقادیر بزرگتر از ۲۸۶/۶ و برای جنسیت ۱ نشان‌دهنده مرد و ۲ نشان‌دهنده زن است. در هر سلول نمودار، دو ستون قرار دارد، ستون سمت چپ نشان‌دهنده توزیع افراد با هموگلوبین A1C کمتر از ۸/۵ و ستون سمت راست نشان‌دهنده توزیع افراد با هموگلوبین A1C بیشتر از ۸/۵ است. طبق نمودار هم در مردان و هم زنان در ردیف نشان‌دهنده ژنوتایپ GG از ۱۱۳۹۱- که با عدد

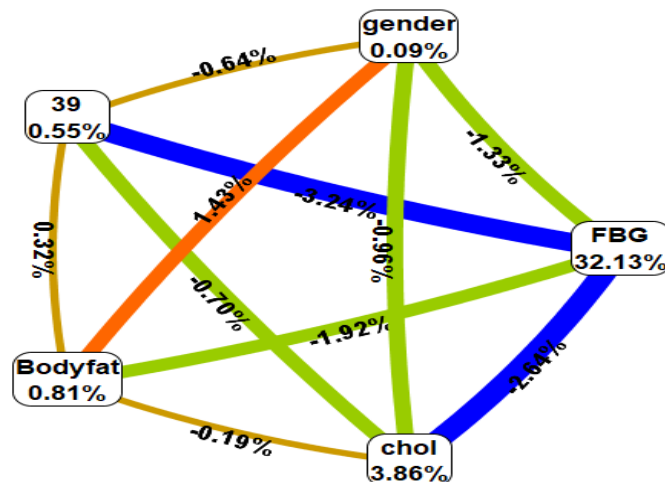
۱ نمایش داده شده است ستون سمت چپ بزرگتر است، این نشان می‌دهد که تعداد زیادی از بیمارانی که هموگلوبین A1C کمتر از ۸/۵ دارند حامل ژنوتایپ هموزیگوت نرمال هستند در ردیف اول نمودار در هر دو جنس هرچه از چپ به راست می‌رویم میزان گلوکز ناشتا زیاد می‌شود که همزمان ستون سمت راست که نشان‌دهنده هموگلوبین A1C بالای ۸/۵ است بزرگتر می‌شود. ردیف دوم توزیع افرادی که ژنوتایپ هتروزیگوت را دارند نشان می‌دهند و توزیع مردان به گونه‌ای است که بیشتر مردان در این ردیف، هموگلوبین A1C بالای ۸/۵ و گلوکز ناشتا با مقادیر بالا دارند. اما در زنان در ردیف مربوط به ژنوتایپ هتروزیگوت توزیع افراد با هموگلوبین کمتر و بیشتر از ۸/۵ یکسان است. در ردیف سوم نمودار که مربوط به ژنوتایپ هموزیگوت جهش یافته است توزیع مردان فقط در بیشترین میزان گلوکز ناشتا و هموگلوبین بیشتر از ۸/۵ دیده می‌شود. در حالی که در زنان، توزیع تقریباً یکسان است. با یک نگاه کلی به نمودار می‌توان استنباط کرد پیشرفت بیماری یا عدم کنترل بیماری در زنان مستقل از نوع ژنوتایپ است در حالی که در مردان به نظر می‌رسد افزایش هموگلوبین A1C و گلوکز ناشتا با نوع ژنوتایپ مرتبط است.

جدول ۵. خلاصه مدل‌های تحلیل کاهش ابعاد چندعاملی برای بررسی برهمکنش بین پلی‌مورفیسم‌ها و عوامل خطر محیطی برای پیش‌بینی عدم کنترل مناسب بیماری در مردان و زنان

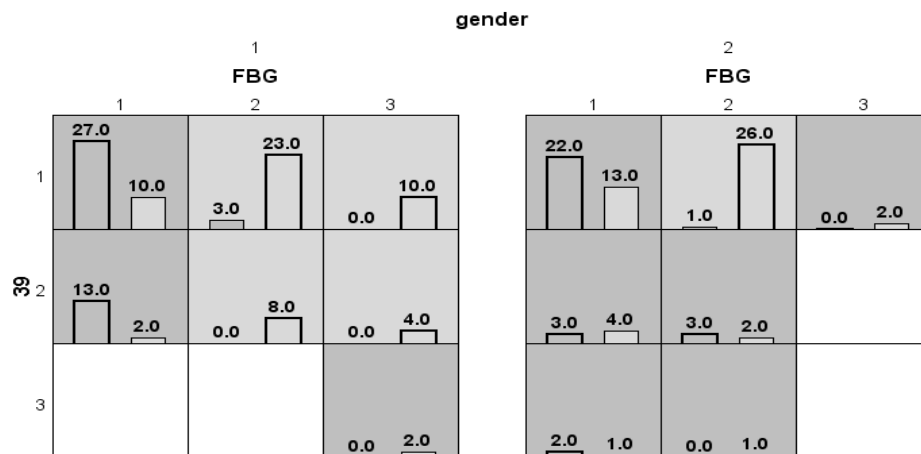
مدل	TBA	CVC	P value
گلوکز ناشتا	۰/۸۱۳۸	۱۰/۱۰	۰/۰۰۱
گلوکز ناشتا، کلاسترول تام	۰/۸۲۱۲	۷/۱۰	۰/۰۰۱
گلوکز ناشتا، rs17300539 جنسیت	۰/۸۲۱۹	۴/۱۰	۰/۰۰۱
گلوکز ناشتا، چربی بدن، rs17300539 جنسیت	۰/۸۱۷۸	۶/۱۰	۰/۰۰۱

بهترین مدل‌های چند عاملی که بیشترین تعامل بین عوامل با بالاترین CVC و حداکثر TBA پیش‌بینی شده است.

TBA: دقت تعادل آزمون، CVC: ثبات اعتبار مقاطع. \*P<0.001 به وسیله آزمون کای اسکوئر ارزیابی شده است.



نمودار ۱. نمودار دایره‌ای آنژروپی تعامل، نشان دهنده اثر متقابل SNPs- عوامل خطر محیطی برای پیش‌بینی عدم کنترل دیابت نوع دوم در مردان و زنان. درصد آنژروپی حذف شده توسط اثر مستقل هر متغیر و همچنین اتصالات زوجی بین آنها در نمودار نشان داده شده است. مقدار مثبت نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی است در حالی که درصد منفی نشان‌دهنده افزونگی یا حشو است. در نمودار، رنگ نارنجی نشان‌دهنده میزان متقابل هم‌افزایی متوسط است، رنگ طلایی نشان‌دهنده نقطه میانی یا استقلال، رنگ سبز نشان‌دهنده افزونگی متوسط است در حالی که رنگ آبی به معنای افزونگی قوی است.



نمودار ۲. نمودار ستونی تعامل بین سه عامل (rs17300539، گلوکز ناشتا و جنسیت) منتخب برای پیش‌بینی عدم کنترل بیماری. برای rs17300539، ۱ نشان‌دهنده GG، ۲ نشان‌دهنده GA، و ۳ نشان‌دهنده AA برای گلوکز ناشتا، ۱ نشان‌دهنده مقادیر کمتر از ۲۱۲/۳، و کد ۲ نشان‌دهنده مقادیر بین ۲۱۲/۳ تا ۲۸۶/۶ همچنین کد ۳ نشان‌دهنده مقادیر بزرگتر از ۲۸۶/۶ و برای جنسیت ۱ نشان‌دهنده مرد و ۲ نشان‌دهنده زن است. برای هر سلول نمودار چند عاملی، ستون سمت چپ درصد توزیع افراد با هموگلوبین A1c کمتر از ۸/۵ را نشان می‌دهند در حالی که ستون سمت راست نشان‌دهنده توزیع افراد با هموگلوبین A1c بیشتر از ۸/۵ است.

## بحث

جنس فقط در بیماران پرداخته شد. به طور کلی طبق نتایج مشاهده‌شده در پژوهش حاضر جنسیت بر تغییر تعاملات بین پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه ژن آدیپونکتین با فاکتورهای خطر محیطی موثر است که این یافته‌ها با نتایج پژوهش طباطبایی و همکاران مطابقت نداشت، این پژوهشگران هیچ تفاوت جنسیتی

در این مطالعه ابتدا توزیع ژنوتایپ و فراوانی آلل پلی‌مورفیسم‌های rs2241766، rs17300539 و rs1501299 ژن آدیپونکتین بین مردان و زنان مبتلا به T2D و سالم مقایسه شد. در گام بعد، به مقایسه تعاملات بین ژنوتایپ و عوامل خطر محیطی بین دو

واضح نیستند. به نظر می‌رسد سهم عوامل ژنتیکی در تفاوت‌های بین جنسی مشاهده شده باید بیشتر مورد بررسی و پژوهش قرار گیرد. جالب توجه است نتایج بررسی در مورد متغیر شاخص توده بدن با درصد چربی بدن در  $\text{SNP} + \text{E5T/G}$  مشابه بود و اختلاف معنی‌داری بین ژنوتایپ‌های TT و GG (با کمتر بودن شاخص توده بدن در دارندگان ژنوتایپ GG) مشاهده شد. این نتایج مشابه با یافته‌های طباطبایی و همکاران در بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن آدیپونکتین با دیابت نوع دو در جمعیت ایرانی بود. از طرفی به طور عکس، دارندگان ژنوتایپ TT هموگلوبین A1c بیشتری نسبت به حاملین ژنوتایپ GG نشان دادند. هموگلوبین A1c بالا نشان‌دهنده دیابت کنترل نشده است، در واقع شرایط هایپرگلیسمیک که به مدت طولانی کنترل نشود می‌تواند در تغییرات وزن و درصد چربی بدن بیماران تاثیر گذار باشد.

اثر متقابل ژنوتایپ-جنسیت بر فاکتورهای خطر محیطی، فقط برای یک متغیر از پروفایل لیپیدی، معنی‌دار بود. تری‌گلیسرید (TG) در بررسی تعامل بین جنسیت و ژنوتایپ در  $\text{SNP} - 11391A/G$  اختلاف معنی‌داری را فقط در گروه زنان نشان داد. جزئیات تفاوت مشاهده شده طبق نتایج آزمون تعقیبی به این صورت بود که فقط در گروه زنان، حاملین ژنوتایپ هموزیگوت نرمال به طور معنی‌داری تری‌گلیسرید کمتری نسبت به سایر ژنوتایپ‌ها داشتند. طبق مطالعات گذشته، غلظت آدیپونکتین با متابولیسم لیپیدها به ویژه، تری‌گلیسرید و لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) مرتبط است و افزایش غلظت آدیپونکتین باعث کاهش TG و افزایش HDL می‌شود (۲۰). شاید این تغییرات به میزان قابل توجهی تحت تاثیر عوامل ژنتیکی اتفاق می‌افتد. هرچند که در این پژوهش سطوح آدیپونکتین پلاسما اندازه‌گیری نشده است. اما شاید تفاوت‌های مربوط به نوع ژنوتایپ یکی از عوامل موثر در علت شناسی ارتباط بین غلظت آدیپونکتین و

در ارتباط بین rs2241766 و rs17300539 با T2D پیدا نکردند (۱۷).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد بین زنان مبتلا به T2D و زنان سالم در توزیع ژنوتایپ و فراوانی آلل در  $\text{SNP} + \text{E5T/G}$  اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در  $\text{SNP} - 11391 A/G$  بین مردان سالم و بیمار این اختلاف مشاهده شد. اما در توزیع ژنوتایپ و فراوانی آلل بین مردان و زنان بیمار هیچ تفاوتی در هیچ یک از پلی‌مورفیسم‌ها مشاهده نشد. در ادامه اثر مستقل جنسیت و اثر مستقل ژنوتایپ و همچنین اثر متقابل جنسیت-ژنوتایپ بر فاکتورهای خطر محیطی مرتبط با T2D بررسی گردید. طبق نتایج، درصد چربی بدن در بیماران دیابتی بر اساس جنسیت متفاوت بود، به طوری که زنان مبتلا به دیابت نسبت به مردان درصد چربی بیشتری داشتند که این اثر مستقل از نوع ژنوتایپ بود. طبق نتایج پژوهش گیر<sup>۱</sup> و همکاران (۱۸)، زنان مبتلا به دیابت، چربی زیرپوستی و محیطی بیشتری نسبت به مردان مبتلا دارند که مطابق با نتایج پژوهش حاضر است. از سه پلی‌مورفیسم مورد مطالعه درصد چربی بدن فقط در  $\text{SNP} + \text{E5T/G}$  اختلاف معنی‌داری را بین ژنوتایپ‌ها نشان داد که بر اساس نتایج آزمون تعقیبی این اختلاف بین حاملین ژنوتایپ‌های TT و GG معنی‌دار بود. بررسی میانگین‌ها حاکی از آن بود که مردان دارنده آلل G درصد چربی بدن کمتری نسبت به مردان دارنده آلل نرمال دارند. در مطالعه‌ای، هانگ و همکاران (۱۹) نشان دادند سطوح آدیپونکتین پلاسما فقط در مردان و نه در زنان به طور معنی‌داری با درصد چربی بدن مرتبط است. آنها پیشنهاد کردند که مکانیسم‌های خاص جنسیتی ممکن است بر ارتباط بین آدیپونکتین و تغییرات ترکیب بدن تأثیر بگذارد. البته که اطلاعات در مورد نحوه تاثیر هورمون‌های جنسی بسیار ضد و نقیض است و مکانیسم‌های اثر گذار در این مورد

<sup>1</sup> Geer

تغییرات سطوح HDL و TG باشد. در این زمینه نیاز به پژوهش‌های بیشتری است. استرادیول‌ها مسیرهایی را در زنان ایجاد می‌کنند که اثر محافظتی قلبی-عروقی و کنترل متابولیسم لیپید در کبد و سطوح لیپوپروتئین سرم دارد، اما این در مورد زنان دیابتی نمی‌تواند به طور بالقوه عمل کند طبق نتایج مطالعات مروری دیابت ممکن است اثرات محافظتی قلبی عروقی در زنان را از طریق مکانیسم‌های ناشناخته کاهش دهد (۲۱). از آنجایی که اختلاف‌های بین ژنوتایپی مشاهده شده برای TG در پژوهش حاضر، وابسته به جنسیت بود و فقط در گروه زنان مشاهده شد، شاید تأثیر پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن‌های مرتبط با T2D بخشی از این مکانیسم‌های ناشناخته باشد.

در ادامه به بررسی مقایسه تأثیر ژنوتایپ‌های پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه بر عدم کنترل مناسب بیماری در دو جنس پرداخته شد و برای این منظور کلیه بیماران در دو گروه افراد با هموگلوبین A1c کمتر از ۸/۵ و افراد با هموگلوبین A1c بیشتر از ۸/۵ دسته‌بندی شدند. با استفاده از آنالیز MDR تعامل بین متغیرهای ژنتیکی و عوامل خطر محیطی برای پیش‌بینی عدم کنترل بیماری مورد بررسی قرار گرفت. این روش آنالیز آماری حتی در صورتی که اثر تعاملی بین متغیرها خطی نباشد هم قادر به تشخیص تعامل است. نتایج در مدل سه عاملی ارائه شده به وسیله آنالیز MDR بسیار جالب توجه بود، در این مدل سه فاکتور گلوکز ناشتا، rs17300539 و جنسیت بیشترین تعامل را برای پیش‌بینی عدم کنترل مناسب بیماری داشتند که بر اساس نتایج نمودار ارائه شده، نوع ژنوتایپ از rs17300539 در زنان تأثیری بر تغییرات هموگلوبین A1c نداشت و به عبارتی دیگر داشتن هموگلوبین A1c بالای ۸/۵ به عنوان معیار فردادی ما برای پیش‌بینی عدم کنترل مناسب بیماری، در زنان مستقل از ژنوتایپ بود در حالی که نتایج نشان داد اکثر مردان با ژنوتایپ هتروزیگوت و

همچنین هموزیگوت جهش یافته برای rs17300539 هموگلوبین A1c بیشتر از ۸/۵ داشتند بنابراین می‌توان گفت پیش‌بینی عدم کنترل مناسب بیماری در مردان با نوع ژنوتایپ مرتبط است.

شاید جست و جو در تغییرات هورمون‌های جنسی بتواند در شفاف‌سازی ساز و کارهای تأثیرگذار در تفاوت‌های مشاهده شده کمک‌کننده باشد. ادبیات در مورد تأثیرات هورمون‌های جنسی بر غلظت آدیپونکتین حاکی از آن است که آندروژن‌ها با آدیپونکتین در مقایسه با استروژن ارتباط نزدیک‌تری دارند برای مثال در مطالعه‌ای گزارش شد سطوح آدیپونکتین به موازات پیشرفت در دوران بلوغ در پسران کاهش می‌یابد، اما در دختران تغییراتی مشاهده نشده است. این کاهش در پسران در حین بلوغ به طور قابل توجهی با سطوح آندروژن پلازما مرتبط بوده است. مطالعه دیگری نشان داد که سطوح آدیپونکتین پلازما در موش‌های بالغ اخته شده افزایش می‌یابد که پس از جایگزینی تستوسترون سطوح آدیپونکتین کاهش نشان داده است (۲۲،۲۳). این مشاهدات تجربی نشان می‌دهد که تستوسترون ترشح آدیپونکتین را از سلول‌های چربی مهار می‌کند (۲۲)، بنابراین، آندروژن‌ها احتمالاً نقش مهمی در تغییرات سطوح آدیپونکتین در حیوانات و همچنین انسان دارند. همچنین آدیپونکتین با گلوبولین متصل به هورمون‌های جنسی (SHBG) همبستگی مثبت بسیار قوی دارد که در نتیجه یک همبستگی معکوس با شاخص آندروژن آزاد دارد (۲۴، ۲۵). طبق نتایج مطالعات گذشته، رابطه قوی آدیپونکتین با SHBG پس از تنظیم برای سن، دور کمر یا BMI پایدار بود که نشان می‌دهد ارتباط مستقیمی بین SHBG و آدیپونکتین، مستقل از چاقی وجود دارد (۲۵). احتمالاً یک اثر مهاری از طریق تستوسترون بر روی ژن آدیپونکتین وجود دارد (۲۵). همچنین بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر و پژوهش‌های اخیر می‌توان گفت احتمالاً بخشی از تفاوت‌های مشاهده شده در

ژنوتایپ پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه ژن آدیپونکتین مرتبط بود اما در زنان این اثر مستقل از نوع ژنوتایپ بود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب رساله دکتری مصوب خانم الهه ممشلی (که بخشی از رساله تحت حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری بود) انجام شده است. نویسندگان از حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، بیماران شرکت کننده در این پژوهش و تمام افرادی که در اجرا و افزایش کیفیت این پژوهش یاری‌رسان و سهیم بودند، کمال قدردانی را دارند.

### منابع مالی

این رساله دکتری با شماره طرح ۹۷۰۱۲۵۳۴ از طرف صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری حمایت مالی شده است.

مورد عملکرد آدیپونکتین بین مردان و زنان از طریق بررسی تنظیم ژنتیکی ژن آدیپونکتین توسط آندروژن‌ها پاسخ داده خواهد شد. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که آدیپونکتین وابسته به جنسیت است و اما به پژوهش‌های بیشتری برای بررسی دقیق تاثیر هورمون‌های جنسی بر آدیپونکتین و متعاقباً اختلاف عملکرد و تاثیرات آدیپونکتین بر فاکتورهای محیطی بین دو جنس نیاز است. پیشنهاد می‌شود پژوهش حاضر با رویکرد بررسی و مقایسه همزمان استروژن و آندروژن‌ها و همچنین اندازه‌گیری سطوح پلاسمایی آدیپونکتین با تعداد نمونه بیشتر انجام شود که شاید بتواند در علت‌شناسی تفاوت‌های مشاهده شده کمک کننده باشد.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی طبق نتایج مشاهده شده در پژوهش حاضر دوشکلی جنسی در برهمکنش بین پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه ژن آدیپونکتین با عوامل خطر محیطی دیابت نوع دو موثر است. در مردان اثر عوامل خطر محیطی (مثل هموگلوبین A1C و گلوکز ناشتا) بر پیشرفت بیماری با نوع

### References

- 1- Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022 Jan;183:109119.
- 2- Mao X, Hong JY, Dong LQ. The adiponectin signaling pathway as a novel pharmacological target. *Mini Rev Med Chem.* 2006 Dec;6(12):1331-40.
- 3- Hossain MM, Murali MR, Kamarul T. Genetically modified mesenchymal stem/stromal cells transfected with adiponectin gene can stably secrete adiponectin. *Life Sci.* 2017 Aug;182:50-6.
- 4- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995 Nov;270(45):26746-9.
- 5- Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, Betoulle D, Péan F, Hadjadj S, et al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *J Diabetes.* 2004 Apr;53(4):1150-7.
- 6- Nelson TL, Stevens JR, Hickey MS. Adiponectin levels are reduced, independent of polymorphisms in the adiponectin gene, after supplementation with  $\alpha$ -linolenic acid among healthy adults. *Metab.* 2007 Sep;56(9):1209-15.

- 7- Antonopoulos AS, Tousoulis D, Antoniadis C, Miliou A, Hatzis G, Papageorgiou N, et al. Genetic variability on adiponectin gene affects myocardial infarction risk: the role of endothelial dysfunction. *Int J Cardiol.* 2013 Sep;168(1):326-30.
- 8- Chiodini BD, Specchia C, Gori F, Barlera S, D'Orazio A, Pietri S, et al. Adiponectin gene polymorphisms and their effect on the risk of myocardial infarction and type 2 diabetes: an association study in an Italian population. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2010 Aug;4(4):223-30.
- 9- Kleisner K, Tureček P, Roberts SC, Havlíček J, Valentova JV, Akoko RM, et al. How and why patterns of sexual dimorphism in human faces vary across the world. *Sci Rep.* 2021 Mar;11(1):1-14.
- 10- Tramunt B, Smati S, Grandgeorge N, Lenfant F, Arnal J-F, Montagner A, et al. Sex differences in metabolic regulation and diabetes susceptibility. *Diabetologia.* 2020 Mar;63(3):453-61.
- 11- Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama.* 2009 Jul;302(2):179-88.
- 12- Pickering RB, Bachman D. *The use of forensic anthropology*, 2<sup>nd</sup> ed. United States of America: crc press; 2009 Jan: 82-110.
- 13- Medicine ACoS. *ACSM's health-related physical fitness assessment manual*, 4<sup>nd</sup> ed. China: Lippincott Williams & Wilkins; 2013 Jan:10-73.
- 14- Hussain M, Khan HN, Awan FR. Development and application of low-cost T-ARMS-PCR assay for AGT and CYP11B1 gene polymorphisms. *Mol Biol Rep.* 2019 Feb;46(1):443-9.
- 15- Miller SA DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb;16(3):1215.
- 16- Wasson MK, Chauhan PS, Singh L, Katara D, Dev Sharma J, Zomawia E, et al. Association of DNA repair and cell cycle gene variations with breast cancer risk in Northeast Indian population: a multiple interaction analysis. *Tumour Biol.* 2014 Jun;35(6):5885-94.
- 17- Tabatabaei-Malazy O, Hasani-Ranjbar S, Amoli MM, Heshmat R, Sajadi M, Derakhshan R, et al. Gender-specific differences in the association of adiponectin gene polymorphisms with body mass index. *Rev Diabet Stud.* 2010 Nov; 7(3):241–246.
- 18- Geer EB, Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med.* 2009 Jan;6:60-75.
- 19- Song HJ, Oh S, Quan S, Ryu O-H, Jeong J-Y, Hong K-S, et al. Gender differences in adiponectin levels and body composition in older adults: Hallym aging study. *BMC Geriatr.* 2014 Dec;14(1):1-8.
- 20- Yanai H, Yoshida H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: mechanisms and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan;20(5):1190.
- 21- Palmisano BT, Zhu L, Eckel RH, Stafford JM. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol Metab.* 2018 Sep;15:45-55.
- 22- Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *J Diabetes.* 2002 Sep;51(9):2734-41.
- 23- Böttner A, Kratzsch Jr, Müller G, Kapellen TM, Blüher S, Keller E, et al. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Aug;89(8):4053-61.
- 24- Oh J-Y, Barrett-Connor E, Wedick NM, Wingard DL. Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women: the Rancho Bernardo study. *Diabetes care.* 2002 Jan;25(1):55-60.
- 25- Gannage-Yared M-H, Khalife S, Semaan M, Fares F, Jambart S, Halaby G. Serum adiponectin and leptin levels in relation to the metabolic syndrome, androgenic profile and somatotrophic axis in healthy non-diabetic elderly men. *Eur J Endocrinol.* 2006 Jul;155(1):167-76.