

ارتباط بین ژنوتیپ‌های واجد یا فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد با عوامل خطر ساز متابولیکی در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت

دکتر غلام بساطی^۱، زهرا ولیزاده^۲، دکتر فاطمه کشاورزی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نقش متابولیک دو آلل مهم گیرنده‌ی هورمون رشد (GHR یا Growth hormone receptor)، که یکی از آن‌ها دارای اگزون ۳ و دیگری فاقد این اگزون است، در ارتباط با عوامل خطر ساز متابولیک دیابت نوع ۲ در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت، در مقایسه با افراد سالم، هنوز به‌درستی مشخص نشده است. در این مطالعه، ارتباط این ژنوتیپ‌ها با عوامل خطر ساز متابولیک دیابت نوع ۲ مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها: برای این مطالعه، ۴۰ فرد مرحله‌ی پیش‌دیابت و ۴۰ فرد سالم بر اساس شاخص‌های بالینی و آزمایشگاهی انتخاب شدند. برای تعیین ژنوتیپ‌ها، نمونه‌ی DNA لکوسیت‌های خون محیطی استخراج و با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مرکب (Multiplex PCR) تکثیر گردید. ژنوتیپ نمونه‌های تکثیر شده با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مشخص شد. بقیه‌ی عوامل خطر ساز مطابق روش‌های استاندارد و کیت‌های مربوط تعیین گردید.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳ [Exon 3 (+/+) GHR] در افراد بیمار به طور معنی‌داری از افراد شاهد بیشتر بود ($P < 0/001$)؛ در حالی که فراوانی ژنوتیپ‌های Exon 3 (+/-) GHR و Exon 3 (-/-) GHR، در افراد شاهد بیشتر از افراد بیمار بود ($P < 0/001$). کاهش میزان عوامل خطر ساز متابولیک در افراد با ژنوتیپ Exon 3 (-/-) GHR چشم‌گیر بود ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: وجود آلل فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد، به ویژه در حالت هموزیگوس، با کاهش عوامل خطر ساز متابولیک دیابت نوع ۲ ارتباط دارد. بنابراین احتمال می‌رود که گیرنده‌ی هورمون رشد فاقد اگزون ۳ فعالیت بیولوژیکی و متابولیکی قوی‌تری داشته باشد تا بتواند در مقابل دیابت نوع ۲ مقاومت نماید.

واژگان کلیدی: اگزون ۳، گیرنده‌ی هورمون رشد، عامل خطر ساز، دیابت نوع ۲

ارجاع: بساطی غلام، ولیزاده زهرا، کشاورزی فاطمه. ارتباط بین ژنوتیپ‌های واجد یا فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد با عوامل

خطر ساز متابولیک در افراد مرحله‌ی پیش‌دیابت. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۵): ۶۰۰-۵۹۱

مقدمه

دیابت نوع ۲ (Type 2 diabetes mellitus) یا T2DM یک بیماری چند عاملی (Multi factorial) و یک مشکل روزافزون در سراسر جهان است. محور

هورمون رشد (Growth hormone یا GH) فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-I) نقش مهمی در کنترل متابولیسم دارد (۱). هورمون رشد اثرات رشد و متابولیسمی خود را از طریق تعامل با گیرنده‌ای که میل

۱- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، سنندج، ایران

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران

این اثرات در حضور مقادیر بالای بعضی از عوامل خطرناک متابولیکی مانند پروتئین فعال C با حساسیت بالا (High-sensitivity C-reactive protein یا hsCRP) و شاخص توده بدنی (Body mass index یا BMI) تغییر می‌کند (۱۰). بعضی تحقیقات نشان داده است که E3 (+) GHR در مقایسه با E3 (-) GHR ارتباط قوی‌تری با عوامل خطرناک متابولیک در افراد چاق دارد (۱۱).

دو واریانت E3 (+) GHR و E3 (-) GHR ممکن است در مرحله‌ی ژنومی (۱۲) یا در مرحله‌ی قطع و وصل (۱۳) به وجود آیند؛ اگر چه، حالت قطع و وصل در انسان هنوز تأیید نشده است (۱۳).

با این حال، ارتباط کاملی بین ژنوتیپ و الگوی بیان mRNA ایزوفرم‌های اگزون ۳ وجود دارد که نشان می‌دهد، اگزون ۳ در سطح ژنی حذف شده و به علت قطع و وصل متغیر (Alternative splicing) به وجود نیامده است (۱۴، ۱۱). از آن جایی که هر دو آلل E3 (+) GHR و E3 (-) GHR در افراد هتروزیگوت به صورت هم‌بارز بیان می‌شوند، هر دو ایزوفرم را می‌توان در سطح رونویسی و همین‌طور، در سطح پروتئینی تشخیص داد (۱۱).

آلل E3 (-) GHR در مقایسه با آلل E3 (+) GHR اثرات بیشتری بر روی پارامترهای بیوشیمیایی و بالینی در بیماران آکرومگالی دارد (۱۵). وجود حداقل یک آلل E3 (-) GHR در افراد جوان سالم و کودکان با ترشح بیشتر انسولین ارتباط دارد و ممکن است نقش مهمی در بالا بردن ظرفیت جبرانی سلول‌های بتای پانکراس داشته باشد (۱۶). به تازگی، ارتباط بین محور هورمون رشد-فاکتور رشد شبه انسولینی (GH/IGF1) با ژنوتیپ‌های دارای آلل E3 (-) GHR

ترکیبی زیادی برای آن دارد، اعمال می‌کند (۲). گیرنده‌ی هورمون رشد (GHR) یا Growth hormone receptor از یک ناحیه‌ی خارج سلولی متصل شونده به لیگاند، یک ناحیه‌ی عبور غشایی و یک بخش داخل سلولی تشکیل شده است که بعد از دی‌مریزه شدن، از طریق فعال کردن مسیرهای JAK-STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) و MAPK (Mitogen-activated protein kinases)، باعث انتقال پیام می‌شود (۳). قسمت خارج سلولی گیرنده‌ی هورمون رشد به صورت محلول در خون نیز یافت می‌شود و به پروتئین متصل شونده به هورمون رشد (Growth hormone binding protein یا GHBP) معروف است (۴). منشأ GHBP در انسان و خرگوش ناشی از قطع پروتئولیتیکی GHR با یک مکانیسم ناشناخته است (۵). شواهد نشان می‌دهند که در اثر عمل پروتئولیتیکی متالوپروتئیناز TACE (آنزیم مبدل فاکتور نکروز توموری آلفا) بر روی GHR، GHBP جدا می‌گردد (۶)؛ فرایند کنده شدن GHBP با میانجی‌گری پروتئین کیناز C وساطت می‌شود (۷). در ارتباط با بخش کدکننده‌ی ناحیه‌ی خارج سلولی GHR، دو ایزوفرم دارای اگزون ۳ (Exon 3) و بدون آن، یعنی به ترتیب E3 (+) GHR و E3 (-) GHR پیشنهاد گردیده است. ایزوفرم بدون اگزون ۳ پلی‌پپتیدی را به وجود می‌آورد که فاقد ۲۲ اسید آمینه در ناحیه‌ی N-ترمینال است (۸).

آلل E3 (+) GHR در مقایسه با آلل E3 (-) GHR پاسخ قوی‌تری نسبت به GH درمانی نشان می‌دهد (۹). به نظر می‌رسد که هموزیگوسیتی E3 (-) GHR اثرات پیش‌گیرانه‌ای در ابتلا به T2DM داشته باشد هرچند که

گرفتند (گلوکز خون ناشتا در همه‌ی افراد سالم کمتر از 100mg/dL بود). افراد بیمار و شاهد از لحاظ سن و جنس با هم مطابقت داشتند. افرادی که دارای سابقه‌ی مصرف هر نوع داروی کاهنده‌ی چربی خون بودند و نیز افراد مبتلا به بیماری‌های التهابی مزمن یا حاد در این مطالعه وارد نگردیدند.

از همه‌ی افراد، یک نمونه‌ی خون ناشتای کامل (۶ میلی لیتر) با استفاده از ماده‌ی ضد انعقاد EDTA (Ethylene-diamine-tetra-acetic) تهیه گردید. سپس، یک بخش از آن به سرعت برای تهیه‌ی DNA ژنومی جدا شد. نمونه‌های DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در دمای 70°C درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. یک بخش دیگر از خون کامل هم برای سنجش HbA1c جدا شد؛ مابقی آن نیز برای جدا سازی پلازما به کار رفت. پلازما نیز در بخش‌های متعدد قسمت بندی شد و برای سنجش بقیه‌ی فاکتورهای مورد سنجش به کار رفت. این نمونه‌ها تا زمان سنجش در دمای 70°C درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

از همه‌ی افراد برای شرکت در مطالعه، رضایت‌نامه‌ی کتبی آگاهانه دریافت گردید و این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب گردید.

DNA ژنومی با استفاده از یک کیت استخراج DNA (Gentra, Puregene, USA) Cat No.158467 مطابق دستورالعمل سازندگان آن از نمونه‌ی خون کامل جدا شد. میزان جذب در طول موج 260nm نانومتر ($OD_{260\text{nm}}$) برای نمونه‌های DNA استخراج شده در محدوده‌ی $0.1-1.0$ بود. همچنین، نسبت جذب OD_{260}/OD_{280} برای آن‌ها در محدوده‌ی $1.7-1.9$

در بیماران آکرومگالی مورد تردید واقع شده است (۱۷). این در حالی است که، اثر ضد دیابتی GHR (-) E3 از طریق ارتباط آن با هورمون رشد و فاکتور رشد شبه انسولینی اعمال می‌گردد (۱۵،۱۰). از طرفی، در دختران مبتلا به سندرم ترنر، هموزیگوسیتی برای ژنوتیپ‌های دارای آلل GHR (-) E3 با تأثیر گذاری بیشتر هورمون رشد و کاهش BMI ارتباط نشان داده است (۱۸).

نقش متابولیکی آلل‌های GHR (+) E3 و GHR (-) E3 در ارتباط با عوامل خطر ساز متابولیک دیابت نوع ۲ (مانند میزان لیپید، گلوکز، هموگلوبین گلیکولیزه (HbA1c) و hsCRP) در افراد مستعد ابتلا به دیابت نوع ۲ یعنی افراد پیش دیابت هنوز بررسی نگردیده است. بررسی ارتباط آلل‌های مذکور در افراد مرحله‌ی پیش دیابت در مقایسه با افراد سالم، نقش عملکرد پاتولوژیک این آلل‌ها را بهتر مشخص می‌سازد و در ارزیابی راهکارهای درمانی برای جلوگیری از ابتلا به دیابت نوع ۲ کمک می‌کند. بدین ترتیب، در این مطالعه نقش آلل‌های مذکور در پاتوژنز بیماری دیابت از طریق تأثیر بر عوامل خطر ساز متابولیکی دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مشاهده‌ای مورد-شاهدی (Observational case-control)، ۴۰ بیمار که بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی مانند میزان گلوکز خون ناشتای 126mg/dL و تست تحمل گلوکز در مرحله‌ی پیش دیابت تشخیص داده شدند. همچنین، ۴۰ فرد سالم بر مبنای گلوکز خون ناشتای کمتر از 125mg/dL به عنوان گروه شاهد در این مطالعه جای

دیناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، جفت و جور شدن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه در دمای ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، و یک مرحله‌ی طویل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد.

این فرایند منجر به تولید محصولات PCR به طول ۹۳۵ bp برای DNAهای حاوی آگزون ۳ و به طول ۵۳۲ bp برای DNAهای فاقد آگزون ۳ شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و اندازه‌ی آن‌ها از طریق مقایسه با DNA ladder به طول قطعات ۱۰۰ bp تخمین زده شد. برای ظاهر کردن باندهای جدا شده روی ژل آگاروز از دستگاه ژل داکيومنتیشن (BioRadm, USA) استفاده شد.

افراد بر حسب داشتن آلل‌های E3 (+) GHR و E3 (-) GHR در سه گروه هموزیگوس برای آلل طبیعی [دارای دو آلل E3 (+) GHR]، هتروزیگوس [دارای یک آلل E3 (+) GHR و یک آلل E3 (-) GHR] و هموزیگوس برای آلل دارای حذف [دارای دو آلل E3 (-) GHR] تقسیم بندی شدند. فراوانی آلل‌های مورد انتظار در همه‌ی افراد و نیز در افراد بیمار و سالم با استفاده از تعادل Hardy-Weinberg محاسبه شد.

میزان گلوکز سرم در حالت ناشتا با روش گلوکز اکسیداز پراکسیداز تعیین گردید. میزان پروفایل لیپیدی پلاسما در حالت ناشتا با روش آنزیماتیک کالری متری و با استفاده از کیت‌های مربوط (پارس آزمون، کرج) اندازه‌گیری شد. میزان hsCRP با

بود. برای بررسی انسجام و یک پارچگی (Integrity) DNA به دست آمده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، همراه بافر 0.5X TE (۵ mM از Tris-HCl و ۰/۵ mM EDTA) با pH برابر ۷/۵ و مارکر DNA و حدود ۱-۵ μg از DNA نمونه‌های استفاده کردیم. قطعات DNA به دست آمده تا ۲۰۰ kb (اغلب ۱۵۰-۵۰ kb) طول داشتند. همان طور که پیشتر ذکر شد، این نمونه‌های DNA ژنومی در لوله‌های اپندورف تا زمان انجام PCR در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مرکب (Multiplex PCR)

برای انجام PCR هر یک از آلل‌های ژن GHR، یعنی E3 (+) GHR و E3 (-) GHR به طور جداگانه با استفاده از پرایمرهای G1، G2، G3 و (Genebank Accession NO. AF155912) در یک واکنش استاندارد زنجیره‌ای پلیمرز حاوی آنزیم TAQ پلیمرز (Invitrogen, USA) و دیگر اجزای لازم، تکثیر شد. پرایمرها مورد استفاده به صورت زیر بود:

G1) 5'-TGTGCTGGTCTGTTGGTCTG-3',
nucleotides 3258-3304 ()
G2) 5'-AGTCGTTTCCTGGGACAGAGA-3',
nucleotides 6534-6515 ()
G3) 5'-CCTGGATTAACACTTTGCAGACTC-3',
nucleotides 4219-4196 ()

این پرایمرها برای تکثیر محصولات دارای آگزون ۳ (۹۳۵ bp)، جفت پرایمر [G1 + G2] و بدون آگزون ۳ (۵۳۲ bp)، جفت پرایمر [G1 + G3] به کار می‌روند (۱۶).

پارامترهای تنظیم ترموسایکلر به صورت زیر بود:

در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات بالینی افراد تحت مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طوری که مشاهده می‌شود، میزان عوامل خطر ساز متابولیک در افراد مرحله‌ی پیش دیابت بیشتر از افراد شاهد است.



شکل ۱. الکتروفورز محصول تکثیر شده‌ی ژن گیرنده‌ی هورمون رشد باندهای ستون اول سمت چپ مربوط به DNA ladder است. ستون‌های بعدی به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های Exon 3 (+/+) GHR، Exon 3 (-/-) GHR و Exon 3 (+/-) GHR می‌باشد.

استفاده از روش ایمونوتوربیدیتری تقویت شده با لاتکس و کیت مربوط (پارس آزمون، کرج) سنجش گردید. میزان گلوکز پلاسما نیز با روش گلوکز اکسیداز و کیت مربوط (پارس آزمون، کرج) تعیین شد. میزان HbA1c گلبول‌های قرمز با استفاده از یک روش استاندارد کروماتوگرافی دفع ژلی (Gel exclusion chromatography) (پارس آزمون، کرج) سنجش شد. این روش دارای همه‌ی مزایا از لحاظ اختصاصیت و صحت است و آسان و مقرون به صرفه نیز می‌باشد.

داده‌ها با کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت میانگین \pm انحراف معیار یا درصد گزارش گردید. برای بررسی تفاوت فراوانی‌های ژنوتیپی بین افراد از آزمون χ^2 استفاده شد. برای مقایسه‌ی داده‌های بالینی بین سه گروه ژنوتیپی از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. سطح معنی داری آماری در حد $P < 0/05$

جدول ۱. مشخصات بالینی افراد تحت مطالعه

متغیر	افراد بیمار (۴۰ نفر)	افراد شاهد (۴۰ نفر)	مقدار P
سن (سال)	۵۵/۷۸ \pm ۱۱/۶۸	۵۶/۹۶ \pm ۸/۳۰	۰/۵۶
مرد [تعداد(درصد)]	۳۲(۸۰)	۳۵(۸۷)	۰/۴۰
شاخص توده‌ی بدنی (BMI) (kg/m ²)	۲۵/۷۹ \pm ۲/۳	۲۵/۹ \pm ۰/۷	۰/۴۸
گلوکز (mmol/l)	۵/۱ \pm ۰/۶	۴/۸ \pm ۰/۴	۰/۵۱
کلسترول (mg/dl)	۱۹۲/۹ \pm ۳۶/۳	۱۷۸/۸ \pm ۴۷/۰	۰/۰۷
تری گلیسرید (TG) (mg/dl)	۱۵۹/۹ \pm ۸۰/۴	۱۴۷/۴ \pm ۹۷/۳	۰/۰۸
LDL (mg/dl)	۱۰۹/۴ \pm ۲۳/۸	۹۶/۷ \pm ۲۵/۵	۰/۰۱
HDL (mg/dl)	۴۴/۴ \pm ۹/۵	۴۲/۵ \pm ۴/۵	۰/۱۲
hsCRP (mg/l)	۴/۹ \pm ۱/۷	۲/۹ \pm ۱/۳	۰/۰۱
HbA1c (درصد)	۵/۸ \pm ۰/۶	۴/۷ \pm ۰/۲	۰/۰۲

داده‌ها برحسب میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است.

LDL: لیپوپروتئین با دانسیته‌ی پایین؛ HDL: لیپوپروتئین با دانسیته‌ی بالا؛

hsCRP: پروتئین فعال C با حساسیت بالا؛ HbA1c: هموگلوبین گلیکوزیله

جدول ۲. فراوانی (نسبی) ژنوتیپ اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد (Exon 3 GHR).

ژنوتیپ	افراد بیمار (۴۰ نفر)	افراد شاهد (۴۰ نفر)	مقدار P
Exon 3 (+/+) GHR	۲۵(۶۲/۵)	۴(۱۰/۰)	< ۰/۰۰۰۱
exon 3 (+/-) GHR	۷(۱۷/۵)	۱۶(۴۰/۰)	۰/۰۰۰۳
exon 3 (-/-) GHR	۸(۲۰/۰)	۲۰(۵۰/۰)	< ۰/۰۰۰۵

Exon 3 (+/+) GHR: ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد؛ Exon 3 (+/-) GHR: ژنوتیپ هتروزیگوت فاقد اگزون ۳؛

Exon 3 (-/-) GHR: ژنوتیپ هموزیگوت فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد.

جدول ۳. مقایسه عوامل خطر ساز متابولیک بین ژنوتیپ‌های مختلف در کل افراد

پارامتر	همه‌ی افراد (۸۰ نفر)	Exon 3 (+/+) GHR (۲۹ نفر)	Exon 3 (+/-) GHR (۲۳ نفر)	Exon 3 (-/-) GHR (۲۸ نفر)	مقدار P
سن (سال)	۵۶/۳۷ ± ۹/۹۹	۵۵/۹۶ ± ۸/۳۹	۵۵/۸۹ ± ۷/۳۳	۵۶/۲۴ ± ۳/۸۱	۰/۶۸
مرد [تعداد(درصد)]	۶۷(۸۴)	۲۳(۷۹)	۱۹(۸۲)	۲۵(۸۶)	۰/۴۳
شاخص توده‌ی بدنی (BMI) (kg/m ²)	۲۵/۸۵ ± ۱/۵۰	۲۶/۵۶ ± ۳/۶۸	۲۵/۹۸ ± ۲/۴۱	۲۵/۰۱ ± ۰/۴۱	۰/۲۰
گلوکز (mmol/l)	۴/۹۵ ± ۰/۳۳	۵/۹۵ ± ۰/۶۲	۴/۶۵ ± ۰/۲۴	۴/۳۲ ± ۰/۳۴	۰/۰۲
کلسترول (mg/dl)	۱۸۵/۸۵ ± ۳۷/۵۳	۱۹۸/۶۲ ± ۴۵/۳۵	۱۸۹/۹۸ ± ۵۷/۳۷	۱۶۹/۲۳ ± ۱۳/۱۳	۰/۰۳
تری‌گیسیرید (TG) (mg/dl)	۱۵۳/۶۵ ± ۸۸/۸۵	۱۷۶/۸۵ ± ۹۱/۵۵	۱۵۹/۶۳ ± ۷۸/۳۳	۱۲۴/۷۱ ± ۸۱/۴۶	۰/۰۱
LDL (mg/dl)	۱۰۳/۰۵ ± ۲۴/۶۵	۱۱۴/۲۵ ± ۳۴/۰۵	۱۰۹/۳۵ ± ۲۷/۲۲	۸۶/۲۷ ± ۱۲/۲۶	۰/۰۱
HDL (mg/dl)	۴۳/۴۵ ± ۵/۷۱	۳۹/۱۵ ± ۶/۱۱	۴۴/۳۵ ± ۳/۶۶	۴۷/۱۶ ± ۴/۰۶	۰/۰۴
hsCRP (mg/l)	۳/۹۰ ± ۱/۴۰	۴/۶۰ ± ۰/۶۰	۴/۲۰ ± ۰/۹۰	۳/۶۰ ± ۱/۲۰	۰/۱۲
HbA1c (درصد)	۵/۲۵ ± ۰/۵۱	۶/۰۷ ± ۰/۷۱	۵/۵۷ ± ۰/۴۴	۴/۱۴ ± ۱/۰۱	۰/۰۲

داده‌ها برحسب میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

LDL: لیپوپروتئین با دانسیته‌ی پایین؛ HDL: لیپوپروتئین با دانسیته‌ی بالا؛ hsCRP: پروتئین فعال C با حساسیت بالا؛ HbA1c: هموگلوبین گلیکوزیله

نشان داده شده است. فراوانی ژنوتیپی در کل افراد، و نیز در گروه بیماران و افراد شاهد، از تعادل Hardy-Weinberg پیروی می‌کرد ($P = ۰/۲۵$). در جدول مشخص است که ($P = ۰/۱۸$, $P = ۰/۲۱$). در جدول مشخص است که فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد [Exon 3 (+/+) GHR] در افراد بیمار به طور معنی‌داری از افراد شاهد بیشتر بوده است؛ در حالی که فراوانی ژنوتیپ‌های هتروزیگوت و همین طور هموزیگوت فاقد اگزون ۳ این گیرنده

الکتروفوز قطعات DNA آل‌های ژن گیرنده‌ی هورمون رشد، وجود ژنوتیپ Exon 3 (+/+) GHR، وجود ژنوتیپ Exon 3 (+/-) GHR و Exon 3 (-/-) GHR را نشان داد (شکل ۱). ملاحظه می‌شود که ژنوتیپ‌های هموزیگوت Exon 3 (+/+) GHR، Exon 3 (-/-) GHR هر کدام دارای یک باند و ژنوتیپ هتروزیگوت Exon 3 (+/-) GHR دارای دو باند بر روی ژل آگاروز است. فراوانی ژنوتیپی افراد بیمار و شاهد در جدول ۲

متابولیک در کودکان دارای اضافه وزن و چاق گزارش گردیده است (۲۲). همچنین، اثر محافظتی این آلل در افزایش دادن میزان ترشح انسولین در کودکان و نوجوانان سالم مشاهده شده است (۱۶). از این لحاظ، کاهش میزان عوامل خطر ساز متابولیک در افراد فاقد اگزون ۳ ژن گیرنده‌ی هورمون رشد در مطالعه‌ی ما با نتایج مطالعات پیش گفته مطابقت دارد. اهمیت متابولیکی آلل فاقد اگزون ۳ زمانی بیشتر مشخص گردید که در یک مطالعه بر روی بیماران مبتلا به آکرومگالی ثابت شد که افراد دارای آلل فاقد اگزون ۳، BMI پایین تر و تحمل گلوکز بهتری نسبت به افراد واجد این آلل دارند (۲۳).

مطالعه‌ی Strawbridge و همکاران نشان داد که هموزیگوسیتی برای ژنوتیپ فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد، دارای اثرات پیش گیرانه در برابر دیابت نوع ۲ است (۱۰). کاهش چشم گیر عوامل خطر ساز متابولیک، به ویژه در افراد با ژنوتیپ هموزیگوت فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد در مطالعه‌ی حاضر، همخوانی بسیار نزدیکی با نتایج مطالعات این محققین دارد.

کاهش فراوانی آلل فاقد اگزون ۳ در افراد مرحله‌ی پیش دیابت در مطالعه‌ی حاضر ممکن است نشان دهنده‌ی این باشد که بعضی از اثرات محافظتی در مقابل دیابت نوع ۲ ممکن است مربوط به وجود این آلل باشد. کاهش شدید عوامل خطر ساز متابولیک دیابت نوع ۲ در افراد با ژنوتیپ هموزیگوت فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد در مطالعه‌ی حاضر، تأیید بیشتری بر این مطلب است. البته باید در نظر داشت که افزایش عوامل خطر ساز متابولیک در افراد مرحله‌ی پیش دیابت تنها یک نشانه از استعداد ابتلا به

[Exon 3 (+/-) GHR و Exon 3 (-/-) GHR]، به ترتیب در افراد شاهد بیشتر از افراد بیمار است. مقایسه عوامل خطر ساز متابولیک بر حسب ژنوتیپ‌های مختلف در میان کل افراد نشان داد که عمده‌ی آن‌ها در افراد حامل آلل Exon 3 (-) GHR به طور چشم گیری کاهش می‌یابند و این وضعیت در افراد با ژنوتیپ Exon 3 (-/-) GHR بیشتر مشهود است (جدول ۳).

بحث

در این مطالعه مشخص گردید که فراوانی ژنوتیپ‌های حاوی حذف اگزون گیرنده‌ی هورمون رشد، به ویژه ژنوتیپ هموزیگوت فاقد اگزون ۳ آن، یعنی Exon 3 (-/-) GHR، در افراد شاهد سالم بسیار بیشتر از افراد بیمار مرحله‌ی پیش دیابت است. همچنین، هنگام بررسی میزان عوامل خطر ساز متابولیک مربوط به دیابت در کل افراد، مشخص گردید که میزان این عوامل خطر ساز در افراد دارای ژنوتیپ فاقد اگزون ۳، به ویژه ژنوتیپ هموزیگوت آن، به طور معنی داری نسبت به افراد با ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳، یعنی Exon 3 (+/+) GHR، پایین تر است. فراوانی ژنوتیپ‌های فاقد اگزون ۳ در کل افراد مورد مطالعه در این تحقیق ۶۳ درصد بود که با فراوانی این ژنوتیپ در مطالعات دیگر همخوانی دارد (۱۹-۲۱).

ارتباط بین ژنوتیپ فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد با عوامل خطر ساز متابولیک در بیماران مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه‌ی Gao و همکاران، اثر محافظتی آلل فاقد اگزون ۳ ژن گیرنده‌ی هورمون رشد در پایین آوردن BMI، کاهش دادن مقاومت به انسولین و در نتیجه، کاهش سندرم

این ژنوتیپ در افراد با خطر بالای دیابت نوع ۲ احساس می‌شود. برای روشن‌تر شدن نتایج این مطالعه نیاز به مطالعاتی با جمعیت گسترده‌تر و در مقیاس وسیع‌تر وجود دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایلام، به دلیل فراهم نمودن شرایط لازم برای انجام این تحقیق، کمال تشکر را دارند. همچنین، از همکاری صمیمانه‌ی مسؤولین محترم بیمارستان مصطفی خمینی ایلام سپاسگزاری می‌شود. در آخر نیز از کمک‌های صمیمانه‌ی دکتر امیر نادر امامی رضوی پژوهشگر انستیتو کانسر تهران در انجام این تحقیق کمال تشکر را داریم. این مقاله حاصل اجرای طرح پژوهشی به شماره‌ی ۶۱۵۳۰۵۱۳۹۰۲۰۰۱ و محل تصویب و اجرای طرح دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان و دانشگاه علوم پزشکی ایلام بوده است.

دیابت نوع ۲ است و عوامل متعدد دیگری نیز در این امر دخیل هستند؛ به ویژه آن‌که، در بین بیماران مرحله‌ی پیش‌دیابت تعدادی دارای ژنوتیپ‌های فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد نیز بودند ولی با این وجود در مرحله‌ی پیش‌دیابت بودند. آن‌چه از یافته‌های این مطالعه برمی‌آید اینست که وجود آلل فاقد اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد، به ویژه در حالت هموزیگوس، با کاهش عوامل خطر ساز متابولیک دیابت مانند گلوکز ناشتا، HbA1c، و پروفایل لیپیدی در کل افراد ارتباط دارد. از طرفی، فراوانی این ژنوتیپ در افراد سالم نیز بسیار بیشتر است. بنابراین احتمال دارد که گیرنده‌ی مذکور فعالیت‌های بیولوژیک و متابولیک قوی‌تری داشته باشد تا در مقابل دیابت نوع ۲ مقاومت نماید. نتایج بعضی از مطالعات این ایده را تأیید می‌کنند (۱۹، ۱۰). با توجه به اهمیت ژنوتیپ هموزیگوت دارای اگزون ۳ گیرنده‌ی هورمون رشد، یعنی Exon 3 (+/+) GHR، به عنوان یک عامل خطر ساز به ظاهر قوی در ایجاد دیابت نوع ۲، ضرورت بررسی

References

1. Dominici FP, Argentino DP, Munoz MC, Miquet JG, Sotelo AI, Turyn D. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm IGF Res* 2005; 15(5): 324-36.
2. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 1987; 330(6148): 537-43.
3. Postel-Vinay MC, Kelly PA. Growth hormone receptor signalling. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; 10(3): 323-36.
4. Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, DeVries BC. A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62(1): 134-41.
5. Sotiropoulos A, Goujon L, Simonin G, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Finidori J. Evidence for generation of the growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. *Endocrinology* 1993; 132(4): 1863-5.
6. Zhang Y, Jiang J, Black RA, Baumann G, Frank SJ. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation. *Endocrinology* 2000; 141(12): 4342-8.

7. Takagi K, Saito Y, Sawada J. Proteasome inhibitor enhances growth hormone-binding protein release. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 182(2): 157-63.
8. Urbanek M, MacLeod JN, Cooke NE, Liebhaber SA. Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. *Mol Endocrinol* 1992; 6(2): 279-87.
9. Dos SC, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougneres P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nat Genet* 2004; 36(7): 720-4.
10. Strawbridge RJ, Karvestedt L, Li C, Efendic S, Ostenson CG, Gu HF, et al. GHR exon 3 polymorphism: association with type 2 diabetes mellitus and metabolic disorder. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17(5): 392-8.
11. Seidel B, Glasow A, Schutt M, Kiess W, Wu Z, Strasburger CJ, et al. Association between the GH receptor/exon 3 genotype and the level of exon 3-positive GH-binding protein in human serum. *Eur J Endocrinol* 2003; 148(3): 317-24.
12. Pantel J, Grulich-Henn J, Bettendorf M, Strasburger CJ, Heinrich U, Amselem S. Heterozygous nonsense mutation in exon 3 of the growth hormone receptor (GHR) in severe GH insensitivity (Laron syndrome) and the issue of the origin and function of the GHRd3 isoform. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(4): 1705-10.
13. Urbanek M, Russell JE, Cooke NE, Liebhaber SA. Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *J Biol Chem* 1993; 268(25): 19025-32.
14. Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem* 2000; 275(25): 18664-9.
15. Mercado M, Gonzalez B, Sandoval C, Esquenazi Y, Mier F, Vargas G, et al. Clinical and biochemical impact of the d3 growth hormone receptor genotype in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(9): 3411-5.
16. Sorensen K, Akglaede L, Munch-Andersen T, Aachmann-Andersen NJ, Leffers H, Helge JW, et al. Impact of the growth hormone receptor exon 3 deletion gene polymorphism on glucose metabolism, lipids, and insulin-like growth factor-I levels during puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(8): 2966-9.
17. Kamenicky P, Dos SC, Espinosa C, Salenave S, Galland F, Le BY, et al. D3 GH receptor polymorphism is not associated with IGF1 levels in untreated acromegaly. *Eur J Endocrinol* 2009; 161(2): 231-5.
18. Binder G, Trebar B, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. Homozygosity of the d3-growth hormone receptor polymorphism is associated with a high total effect of GH on growth and a low BMI in girls with Turner syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68(4): 567-72.
19. Stallings-Mann ML, Ludwiczak RL, Klinger KW, Rottman F. Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(22): 12394-9.
20. Padidela R, Bryan SM, Abu-Amro S, Hudson-Davies RE, Achermann JC, Moore GE, et al. The growth hormone receptor gene deleted for exon three (GHRd3) polymorphism is associated with birth and placental weight. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76(2): 236-40.
21. Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(2): 659-64.
22. Gao L, Zheng Z, Cao L, Shen S, Yang Y, Zhao Z, et al. The growth hormone receptor (GHR) exon 3 polymorphism and its correlation with metabolic profiles in obese Chinese children. *Pediatr Diabetes* 2011; 12(4 Pt 2): 429-34.
23. Montefusco L, Filopanti M, Ronchi CL, Olgiati L, La-Porta C, Losa M, et al. d3-Growth hormone receptor polymorphism in acromegaly: effects on metabolic phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72(5): 661-7.

Relationship between Exon 3 (+/-) Genotypes of Growth Hormone Receptor and Metabolic Risk Factors in Patients in Pre-diabetic State

Gholam Basati PhD¹, Zahra Valizadeh MSc³, Fatemeh Keshavarzi PhD²

Original Article

Abstract

Background: Metabolic impacts of two important alleles of the growth hormone receptors (GHR), one with retention of exon 3 [exon 3 (+) GHR] and the other with the deletion of it [exon 3 (-) GHR], on the metabolic risk factors of type 2 diabetes mellitus (T2DM) are really unknown. We aimed to evaluate relationships between the genotypes and metabolic risk factors of T2DM.

Methods: In the present study, 40 patients in pre-diabetic state and 40 healthy subjects were selected based on their clinical and laboratory evidence. For genotyping, DNA was extracted from the leukocytes of peripheral blood and amplified by multiplex polymerase chain reaction method. Genotypes of the amplified DNA samples were resolved using 1.5% agarose gel electrophoresis. Other risk factors were also determined by using standard methods and appropriate kits.

Findings: Frequency of the homozygote exon 3 retained genotype [exon 3 (++) GHR] was significantly higher in the subject in pre-diabetic state ($P < 0.001$); the frequency of exon 3 (+/-) GHR and exon 3 (-/-) GHR genotypes were significantly higher in the control subjects ($P < 0.001$). The decrease of metabolic risk factors was profound in subjects with exon 3 (-/-) GHR genotype ($P < 0.001$).

Conclusion: The presence of exon 3 deleted allele of GHR, especially in the homozygosity situation, was associated with decreased levels of the metabolic risk factors of type 2 diabetes mellitus. So, the exon 3 deleted GHR may have more robust biological and metabolic activities lead to the resistance against T2DM.

Keywords: Exon 3, Growth hormone receptor, Risk factor, Type 2 diabetes mellitus

Citation: Basati G, Valizadeh Z, Keshavarzi F. **Relationship between Exon 3 (+/-) Genotypes of Growth Hormone Receptor and Metabolic Risk Factors in Patients in Pre-diabetic State.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(235): 591-600

1- Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Allied Medical Science, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

2 Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kurdistan Science and Research Branch, Sanandaj, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran

Corresponding Author: Fatemeh Keshavarzi PhD, **Email:** gol.keshavarzi@gmail.com