Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Association study of the rs46522 polymorphism in *UBE2Z* and rs7903146 polymorphism in *TCF7L2* gene with T2DM in Arab population of Khuzestan province: case-control study

Sana Shafidelpour[1*], Ali Mohammad Foroughmand[1], Merhrnoosh Zakerkish[2], Mahdi Pourmahdi Borujeni[3]

[1]Department of Genetics, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2]Department of Endocrinology and Metabolism, Health Research Institute, Diabetes Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3]Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
*Corresponding author; E-mail: s.shfidlpr@gmail.com

Received: 24 February 2018 Accepted: 24 June 2018 First Published online: 19 Dec 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 February- March; 41(6):59-66

Abstract

Background: The prevalence of Type 2 diabetes (T2DM) has been increasing rapidly. Transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) has been found to has a strong role in the pathogenesis of T2DM. This gene codes an important transcription factors in the Wnt signaling pathway which secrets in pancreatic β-cells and other tissues. Significant associations have been showed between rs7903146 and T2D risk in nearly all populations. Also many loci such as *UBE2Z* rs46522 that is affecting by *TCF7L2* transcription factor have been found associated with T2D. Our objective was to explore whether mentioned SNPs are associated with the risk of T2D among our Arab population of Khuzestan.

Methods: We performed a case-control study using 100 T2D patients (WHO criteria), and 97 controls (age > 30; with FBS ≥126 mg/dl) of Arab people of Khuzestan province. Genotyping was performed by PCR-RFLP and was confirmed by direct sequencing. Statistical analyses were performed using SPSS version 16.0.

Results: No significant difference in genotype frequencies was observed between the T2DM patients and normoglycemic controls. The rs7903146 (C/T) polymorphism odds ratios for CC and TC genotypes were 1.75 (95% CI, 0.63 to - 4.88; p= 0.28) and 0.94 (95% CI, 0.49 to - 1.79; p= 0.84) compared with the TT genotype, respectively. The rs46522 (C/T) polymorphism odds ratios for TT and TC genotypes were 1.41 (95% CI, 0.58 to - 3.42; p= 0.45) and 1.22 (95% CI, 0.64 to - 2.35; p= 0.54) compared with the CC genotype, respectively.

Conclusion: Our study indicates no association of T2D in Arab population of Khuzestan province with the rs7903146 *and rs46522* and rs46522 variants.

Keyword: T2DM, Khuzestan, rs7903146, *UBE2Z*, rs46522, *TCF7L2*

How to cite this article: Shafidelpour S, Foroughmand A M, Zakerkish M, Pourmahdi Borujeni M. [Association study of the rs46522 polymorphism in UBE2Z and rs7903146 polymorphism in TCF7L2 gene with T2DM in Arab population of Khuzestan province: case-control study]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 February- March; 41(6):59-66. Persian.

© 2020 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

بررسی همراهی پلی‌مورفیسم‌های rs46522 در ژن *UBE2Z* و rs7903146 در ژن *TCF7L2* با دیابت نوع دو در جمعیت عرب استان خوزستان: مطالعه‌ی مورد-شاهدی

سناء شفیدل‌پور[۱*]، علی‌محمد فروغمند[۱]، مهرنوش ذاکرکیش[۲]، مهدی پورمهدی بروجنی[۳]

[۱] دانشجوی ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران
[۲] گروه متابولیسم و غدد درون‌ریز، مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران
[۳] گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران
[*] نویسنده مسوول؛ ایمیل: s.shfidlpr@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۵ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۹/۲۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. بهمن و اسفند ۱۳۹۸؛ ۴۱(۶):۵۹-۶۶

چکیده

زمینه: بروز دیابت نوع ۲ تحت تاثیر تعامل عوامل وراثتی با عوامل محیطی است. تاکنون حدود ۶۰ لوکوس ژنتیکی مرتبط با این بیماری شناسایی شده است که در این میان ژن *TCF7L2* از بیشترین اهمیت برخوردار است. یکی از لوکوس‌های تحت تاثیر ژن *TCF7L2* که همراهی آن نیز با دیابت نوع ۲ اخیرا مشخص شده است، لوکوس دربردارنده‌ی ژن *UBE2Z* (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2Z), می‌باشد. در این مطالعه به بررسی همراهی پلی‌مورفیسم‌های rs7903146 در ژن *TCF7L2* و rs46522 در ژن *UBE2Z* با دیابت نوع ۲ در جمعیتی از اقوام عرب استان خوزستان پرداخته شد.

روش‌کار: تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی بیمار و ۹۷ نمونه‌ی کنترل از جمعیت عرب ساکن استان خوزستان جمع‌آوری شد. تعیین ژنوتیپ این افراد با روش PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) صورت گرفته و با توالی‌یابی مستقیم تایید شد. آنالیزهای آماری بوسیله نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶.۰) انجام شد. تست $\chi 2$ و رگرسیون لاجستیک برای مقایسه نسبت‌های ژنوتیپی و آللی استفاده شد.

نتیجه‌گیری: در بررسی rs7903146 با مبنا قرار دادن ژنوتیپ TT، مقدار OR برای ژنوتیپ‌های CC و CT به ترتیب برابر با ۱/۷۵ (p=۰/۲۸، ۴/۸۸ – ۰/۶۳، CI ۹۵٪) و ۰/۹۴ (p=۰/۸۴، ۱/۷۹ – ۰/۴۹، CI ۹۵٪) بدست آمد. برای rs46522 با مبنا قرار دادن ژنوتیپ CC، مقدار OR برای ژنوتیپ‌های TT و TC به ترتیب برابر با ۱/۴۱ (p=۰/۴۵، ۳/۴۲ – ۰/۵۸، CI ۹۵٪) و ۱/۲۲ (p=۰/۵۴، ۲/۳۵– ۰/۶۴، CI ۹۵٪) محاسبه شد. در مطالعه‌ی هر دو واریانت تفاوت معناداری بین فراوانی ژنوتیپی و اللی گروه کنترل و بیمار مشاهده نشد. این مطالعه همراهی واریانت‌های rs46522 و rs790314 با دیابت نوع ۲ در جمعیت مورد مطالعه را تایید نکرد.

.

کلید واژه‌ها: دیابت نوع ۲، خوزستان، *TCF7L2*، rs790314، *UBE2Z*، rs46522

نحوه استناد به این مقاله: شفیدل‌پور س، فروغمند ع م، ذاکرکیش م، پورمهدی بروجنی م. مطالعه‌ی همراهی پلی‌مورفیسم‌های rs46522 در ژن UBE2Z و rs7903146 در ژن TCF7L2 با دیابت نوع دو در جمعیت عرب استان خوزستان: مطالعه‌ی مورد-شاهدی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۶):۵۹-۶۶

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

دیابت به عنوان بزرگ‌ترین و بحث برانگیزترین اپیدمی قرن، بیشترین افزایش تعداد بیمار را در کل جهان داشته است (۱). بطوری که حدود ۲۲۰ میلیون نفر در دنیا به دیابت مبتلا می‌باشند (۲) و پیش‌بینی می‌شود جمعیت مبتلایان به دیابت در جهان تا ۲۰ سال آینده از مرز ۳۳۰ میلیون نفر بگذرد که در این مدت میزان افزایش تعداد مبتلایان به دیابت در جوامع در حال توسعه و توسعه یافته به ترتیب ۱۷٪ و ۴۲٪ خواهد بود. شیوع این بیماری در ایران در سال ۲۰۱۰ در جمعیت بین ۷۹ تا ۲۰ ساله ۳/۹٪ گزارش شد (۳). طبق تخمین (International Diabetes Federation, IDF) ایران تا سال ۲۰۳۰ به یکی از پر شیوع‌ترین مناطق جهان به لحاظ ابتلا به دیابت تبدیل می‌شود (۴). دیابت نوع ۲ که ۹۰٪ از کل موارد ابتلا به دیابت را تشکیل می‌دهد، یک اختلال متابولیک توازن سوخت است که به صورت هیپرگلیسمی و تغییر متابولیسم چربی در اثر مقاومت سلول‌های بدن به انسولین مشخص می‌گردد. بار این بیماری به دلیل افزایش سریع شیوع کلی آن، آسیب مخربی که می‌تواند در بسیاری از اعضا ایجاد نماید، و هزینه‌های مستقیم و غیرمستقیم آن، بسیار زیاد است (۵). لذا می‌توان دیابت را به عنوان یک مشکل بزرگ و به سرعت در حال گسترش برای سلامت عمومی جهان و بخصوص کشور معرفی کرد که گروه‌های تحقیقاتی زیادی در سرتاسر جهان برای مقابله با آن، در حال مطالعه می‌باشند (۶). دیابت یک بیماری چند عاملی بوده و عوامل زیادی مانند تغذیه، عوامل محیطی، سن، جنس، نژاد، فعالیت بدنی و وراثت در ابتلا و یا بروز آن دخالت دارند. از این‌رو توسعه ابتلا به دیابت نوع ۲ با ترکیبی از شیوه زندگی و عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیک در ارتباط می‌باشد. تاکنون حداقل ۳۶ لوکوس ژنی شناسایی شده است که در ابتلا به دیابت نقش دارند. در این میان *TCF7L2* قوی‌ترین لوکوس مستعدکننده‌ی دیابت نوع ۲ شناخته شده است. البته انتظار می‌رود که تعداد ژن‌ها و تغییرات ژنتیکی مرتبط با این بیماری در آینده افزایش یابد (۷). ژن *TCF7L2* گستره‌ای به طول ۹۲۱۵ Kb را روی کروموزوم ۱۰ (q25.310) در برگرفته و یک فاکتور رونویسی کد می‌کند که نقش مهمی در مسیر پیام‌رسانی Wnt ایفا نموده و با هموستازی گلوکز خون مرتبط است. این ژن از طریق تنظیم بیان ژن هورمون‌های اینکرتین (incretin)، به واسطه‌ی مسیر پیام‌رسانی WNT، در تنظیم ترشح انسولین نقش دارد (۸). پس از انتشار اولین گزارش همراهی ریز ماهواره DG10S487 در اینترون سوم ژن *TCF7L2* با دیابت نوع ۲، مطالعات دیگری نیز انجام شد و همراهی تعدادی از واریانت‌های *TCF7L2* به خصوص rs12255372 و rs7903146 با دیابت نوع ۲ در جمعیت‌هایی با نژادهای مختلف از جمله انگلیسی، هلندی، آمیش، فنلاندی، سویسی، فرانسوی، آمریکایی، هندی، ژاپنی و ... تایید گشت. به علاوه مطالعه‌ی انجام گرفته روی سلول‌های جزایر پانکراس انسان نشان داد که کروماتین در محل DNA حامل الل T (rs7903146) فشردگی نسبتا کمتر و بیان بیشتری دارد (۹). گزارشات اخیر اهمیت عناصر تنظیم‌کننده سیس، در نواحی غیر کدکننده ژن *TCF7L2* را روشن ساخته‌اند که بر ارتباط قوی بین تشدیدکننده‌های رونویسی واقع در محدوده‌ی وسیعی از این نواحی و T2DM دلالت دارند. این عناصر نقش حیاتی در هموستازی گلوکز دارند (۱۰). مطالعاتی نیز در تایید این ایده نشان داده‌اند SNP هایی که همراهی بسیار قوی با T2D دارند مانند rs7903146 در مناطق باز کروماتین واقع‌شده و باعث افزایش فعالیت تشدید کننده‌ها می‌شوند. البته این تأثیر، وابسته به الل همراه با ریسک خطر (T) در مقابل الل (C) می‌باشد (۱۱). اما به هرحال SNPهای خطرزای این ژن، در مناطق اینترونی قرار گرفته‌اند و همین امر فهم مکانیسم عمل این واریانت‌ها را در افزایش خطر ابتلا به T2DM مشکل کرده است. بطوری که هنوز دقیقا مشخص نشده است که این واریانت‌ها، بر پیرایش متغیر ژن یا بر بیان ژن و یا بر ساختار پروتئین آن اثر می‌گذارند (۱۳). مطالعات نشان می‌دهند وجود الل T واریانت rs7903146 با افزایش رونویسی ژن *TCF7L2* و کاهش مقدار پروتئین مربوطه در بافت پانکراس همراه است (۱۴). به لحاظ بالینی اینکرتین‌ها در تحریک ترشح انسولین و گلوکاگون (با اثرگذاری بر سلول‌های آلفا و بتای پانکراس) و متابولیسم گلوگز نقش دارند. به علاوه اینکرتین‌ها در تحریک میتوز، تحریک نئوژنز و مهار آپوپتوز و در نتیجه، افزایش توده سلول‌های بتای پانکراس نقش دارند. عدم تولید صحیح و بجای اینکرتین‌ها، عدم تنظیم صحیح این فرآیندها، کاهش ترشح انسولین و در نتیجه افزایش خطر ابتلا به دیابت را به دنبال دارد (۵،۶). فاکتور رونویسی *TCF7L2* کنترل‌کننده‌ی رونویسی ژن پروگلوکاگن، (به واسطه‌ی مسیر پیام‌رسانی WNT) می‌باشد که طی تغییرات بعد از ترجمه در روده، به GLP-1 (هورمون اینکرتین) تبدیل می‌شود. اثر دیابتوژنیک واریانت‌های خطرزای ژن *TCF7L2* از طریق کاهش رسپتورهای GLP-1 در سلول‌های جزایر پانکراسی افراد دیابتی و همچنین کاهش اثرات پپتید شبه‌گلوکاگن-۱ (GLP-1) و در نتیجه از بین رفتن توانایی GLP-1 در تحریک ترشح انسولین و تکثیر و تزاید سلول‌های بتا، کاهش توده سلولی بتا در افراد دیابتی نسبت به افراد سالم، نقص در پردازش و ترشح انسولین، و افزایش تولید گلوکز کبدی می‌باشد (۱۷،۱۶). یکی از لوکوس‌های تحت تاثیر *TCF7L2* که همراهی آن با دیابت نوع ۲ اخیرا مشخص شده است، لوکوس دربردارنده‌ی ژن *UBE2Z* می‌باشد (۱۸). ژن *UBE2Z* گستره‌ای به طول ۱۶/۵ کیلوباز را روی کروموزوم ۱۷ انسان (q21.3217) در برگرفته و متشکل از ۶ اگزون و ۵ اینترون می‌باشد. ژن *UBE2Z* به طور گسترده در ۱۶ بافت انسان و به خصوص به مقدار فراوان در

جفت، پانکراس، طحال و بیضه‌ها بیان شده و نقش مهمی در یوبیکوئیتیناسیون ایفا می‌کند. سیستم یوبیکوئیتیناسیون (اتصال کوالان پروتئین یوبیکوئیتین به سایر پروتئین‌های سلول) که مختص به سلول‌های یوکاریوت می‌باشد، یکی از مهم‌ترین اجزاء شرکت-کننده در مکانیسم تجزیه‌ی پروتئین‌ها است و آنزیم *UBE2Z* یکی از آنزیم‌های مهم این سیستم و از خانواده‌ی کلاس II آنزیم‌های متصل‌کننده‌ی یوبیکوئیتین E2 می‌باشد (۱۹). در سال ۲۰۱۱، برای اولین بار، Schunkert و همکاران با انجام مطالعات همراهی، پلی‌مورفیسم rs46522 (واقع در اینترون دوم ژن *UBE2Z*) را به عنوان واریانت خطرزای CAD (Coronary Artery Disease)، معرفی نمودند (۲۰). از آن پس همراهی الل T واریانت rs46522 با CAD در مطالعات دیگر، از جمله مطالعات GWAS، Erbilgin و همکاران در سال ۲۰۱۳، نیز بررسی و تائید شد (۲۱). در سال ۲۰۱۳، Erbilgin و همکاران بیان تعدادی از لوکوس‌های مرتبط با CAD از جمله لوکوس *UBE2Z-GIP-ATP5G1-SNF8* را در بافت‌های مختلف انسان و موش بررسی نمودند و نشان دادند که rs46522 (در ژن UBE2Z) در بافت‌های مختلف انسان و موش، با تغییر متنوع بیان ژن‌های مختلف این لوکوس، در سطوح متفاوت پیشرفت بیماری، همراهی نشان می‌دهد. که آن‌ها این تفاوت را حاکی از نقش پیچیده‌ی ژن‌های این لکوس در ایجاد CAD و مکانیسم‌های بیماری‌زایی متفاوت در این بافت‌ها دانستند (۲۱). در سال ۲۰۱۴ Johnson و همکاران (۱۸) با تلفیق اطلاعات به دست آمده از بررسی سایت‌های اتصال فاکتور رونویسی TCF7L2 در چند رده‌ی سلولی، با نتایج حاصل از بررسی‌های ارتباط rs46522 ژن*UBE2Z* با CAD (در مطالعات GWAS)، لوکوس *UBE2Z* rs46522 را برای اولین بار، مرتبط با دیابت نوع ۲ معرفی نمودند (۱۸). نقش دقیق فاکتور رونویسی *TCF7L2* در رونویسی ژن *UBE2Z* (ژن زیردست *TCF7L2*) و نقش دقیق ژن *UBE2Z* در افزایش خطر ابتلا به CAD و T2DM هنوز به خوبی مشخص نشده است. با وجود نتایج ارزشمند به دست آمده در زمینه شناسایی ژن‌ها و تغییرات ژنتیکی مرتبط با دیابت در دهه گذشته، عدم هم‌خوانی و تکرارپذیری نتایج به دست آمده در جمعیت‌های مختلف یکی از چالش‌های پیش رو در این زمینه می‌باشد. از این رو بررسی دوباره‌ی یافته‌های به دست آمده از مطالعات همبستگی گسترده‌ی ژنوم در جمعیت‌های بومی و تعیین سهم اثر هر یک از واریانت‌های دخیل در آن به منظور رسیدن به یک جمع‌بندی مستدل در رابطه با ژن‌ها و تغییرات ژنتیکی مرتبط با دیابت امری ضروری است. همچنین با توجه به گسترش رویکردهای درمانی جدید از جمله (پزشکی شخصی) برای کنترل و مقابله با بیماری‌های چند عاملی، انجام مطالعات همراهی و تعیین هاپلوتایپ در هر نژاد و قومیت و جمع‌بندی این اطلاعات می‌تواند در آینده به درمان و کنترل این بیماری‌ها کمک شایانی بکند. لذا در این مطالعه (برای اولین بار) به بررسی همراهی واریانت‌های rs7903146 *TCF7L2* و rs46522 *UBE2Z* با دیابت نوع ۲ در جمعیتی از اقوام عرب در استان خوزستان پرداخته شد.

روش کار

این مطالعه به صورت مورد–شاهدی انجام شده و بیماران از میان مراجعین به کلینیک فوق تخصصی بیمارستان گلستان اهواز انتخاب شدند. نمونه‌گیری به روش تصادفی انجام شده و گزینش افراد بیمار و سالم تحت نظر متخصص هورمون و غدد انجام شد. در ضمن پرسش‌نامه‌هایی تهیه و طراحی شدند که در این پرسش‌نامه‌ها سؤال‌هایی در مورد سن، قومیت، سابقه‌ی ابتلا در خویشاوندان درجه یک، میزان قند خون ناشتا، میزان تری‌گلیسرید و کلسترول آورده شده است. افرادی که اطلاعات مربوط به پرسش‌نامه آن‌ها موجود نبود از مطالعه حذف شدند. افراد کنترل از بین مراجعین به بیمارستان ولیعصر خرمشهر و بیمارستان گلستان اهواز انتخاب شدند. در مورد این گروه که همگی، هیچ‌گونه سابقه‌ی ابتلا به T2DM در خود و خویشاوندان درجه یک نداشتند همچنین پرسش‌نامه‌هایی مشابه گروه بیمار تهیه شد. ضمناً تمامی افراد هر دو گروه بیمار و کنترل، ساکن استان خوزستان و از اقوام عرب بودند و از اهداف مطالعه آگاه بوده و با رضایت آگاهانه در مطالعه شرکت نمودند. اطلاعات مربوط به شاخص‌های بیوشیمیایی افراد بیمار (قند ناشتا، کلسترول، تری‌گلیسرید و...) از پرونده‌ی پزشکی و بر اساس آخرین آزمایشات آن‌ها استخراج شد. و اطلاعات مربوط به شاخص‌های بیوشیمیایی افراد سالم از آخرین نتایج آزمایشات آن‌ها استخراج شد. از افراد بیمار و کنترل حدودا ۵ میلی‌لیتر خون در لوله‌های فالکون حاوی EDTA ۰/۵ مولار (جهت لخته نشدن خون) جمع‌آوری گردید. سپس نمونه‌ها در فریزر ۳۰- نگهداری شد. استخراج DNA به روش نمک اشباع (Salting out) انجام گرفت و جهت تعیین ژنوتیپ rs46522 *UBE2Z*و rs7903146 *TCF7L2* از روش PCR-RFLP استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر توالی در بردارنده‌ی واریانت rs7903146 به صورت زیر است: (جهت ایجاد سایت برش آنزیم محدود کننده‌ی RsaI، در موقعیت سوم از سمت ´۳ پرایمر فورارد از یک باز غیر مکمل (Missmatch base) استفاده کردیم.)

F- primer: 5′- TTAGAGAGCTAAGCACTTTTTAGGTA – 3′
R- primer: 5′- AGAGATGAAATGTAGCAGTGAAGTG – 3′

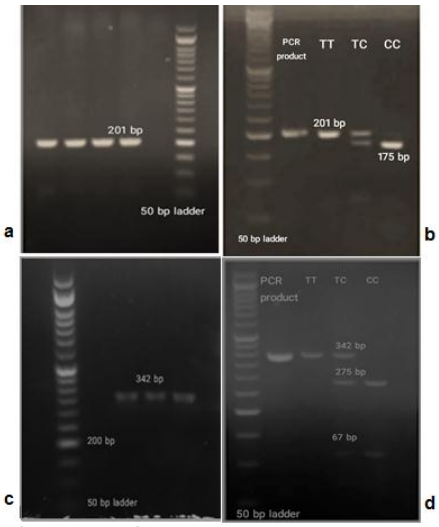
برنامه‌ی دمایی به کار رفته برای تکثیر قطعه‌ی حاوی rs7903146 به صورت زیر است: مرحله‌ی اول یک سیکل واسرشت اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد. مرحله‌ی دوم ۳۵ سیکل شامل واسرشت ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد ظرف مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن اولیه در دمای ۷۲

درجه‌ی سانتی‌گراد در مدت ۴۵ ثانیه. مرحله‌ی سوم یک سیکل طویل‌شدن ثانویه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد. محصول این واکنش PCR، برای تایید اندازه‌ی قطعات حاصله بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد (شکل ۱ قسمت a). در روش RFLP برای تعیین ژنوتیپ افراد برای این واریانت از آنزیم RsaI (مقدار ۰/۸ میکرولیتر برای هر نمونه) استفاده شد و نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. آنزیم RsaI طبق الگوی '۵...3GTAC↓'در توالی DNA شکست ایجاد می‌کند. '۳...5CA↑TG'

با توجه به الگوی برش این آنزیم، اگر در توالی تکثیرشده توسط PCR، در نقطه rs7903146، فرد مورد نظر دارای الل C باشد، آنزیم جایگاه برش داشته و قطعه ۲۰۱ جفت بازی به دو قطعه ۱۷۵ و ۲۶ شکسته می‌شود و اگر فرد مورد نظر در این نقطه دارای الل T باشد، آنزیم جایگاه برش نداشته و برشی ایجاد نمی‌شود. چنانچه فردی هر دو آلل به ارث رسیده از والدینش آلل C باشد، در نتیجه‌ی شکست آنزیمی، دو قطعه ۱۷۵ و ۲۶ جفت بازی دیده خواهد شد و اگر هر دو آلل به ارث رسیده T باشد، یک قطعه ۲۰۱ جفت بازی دیده خواهد شد و همچنین اگر دارای یک آلل C و یک آلل T باشد، هر سه قطعه دیده می‌شود. البته لازم به ذکر است که قطعه‌ی ۲۶ جفت بازی به علت کوچک و سبک بودن به سرعت از ژل خارج می‌شود و در تصویر نهایی ژل دیده نمی‌شود (شکل ۱ قسمت b). پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر توالی دربردارنده‌ی واریانت rs7903146 و همچنین آنزیم محدودکننده‌ی مناسب برای برش این ناحیه از منبع استخراج شد (۹). پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر توالی دربردارنده‌ی واریانت rs46522، که با استفاده از نرم‌افزار Alell ID6 طراحی شد، به‌صورت زیر است:

F- primre: 5′- GCTCACCTCTCCGATTACAC- 3′
R- primer: 5′- GGAAGGTTGGGAATAGGGC-3′

برنامه‌ی دمایی به کار رفته برای تکثیر قطعه‌ی حاوی rs46522 به صورت زیر است: مرحله‌ی اول یک سیکل واسرشت اولیه به مدت ۷ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد. مرحله‌ی دوم ۳۵ سیکل شامل واسرشت ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ظرف مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن اولیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در مدت ۲۵ ثانیه. مرحله‌ی سوم یک سیکل طویل شدن ثانویه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد. نتیجه حاصله به وسیله‌ی الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد (شکل ۱ قسمت c). پس از بررسی توالی دربردارنده‌ی rs46522 با استفاده از سایت NEBcutter2 مشخص شد که آندونوکلئاز محدودکننده (BseGI BtsCI) می‌تواند این پلی‌مورفیسم را تعیین ژنوتیپ کند. مقدار ۰/۵ میکرولیتر از این آنزیم برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه استفاده شد. این آنزیم طبق الگوی '۵...3GGATGNN↓'در توالی شکست ایجاد می‌کند. '۳...5CCTAC↑NN'با توجه به الگوی برش این آنزیم، اگر در توالی تکثیر شده توسط PCR، در نقطه rs46522، فرد مورد نظر دارای الل C باشد آنزیم جایگاه برش داشته و قطعه ۳۴۲ جفت بازی به دو قطعه ۲۷۵ و ۶۷ شکسته می‌شود و اگر فرد مورد نظر در این نقطه دارای الل T باشد آنزیم جایگاه برش نداشته و برشی ایجاد نمی‌شود. چنانچه فردی هر دو آلل به ارث رسیده از والدینش آلل C باشد، درنتیجه‌ی شکست آنزیمی، دو قطعه ۲۷۵ و ۶۷ جفت بازی دیده خواهد شد و اگر هر دو آلل به ارث رسیده T باشد، یک قطعه ۳۴۲ جفت بازی دیده خواهد شد و همچنین اگر دارای یک آلل C و یک آلل T باشد، هر سه قطعه دیده می‌شود (شکل ۱ قسمت d).



شکل ۱: a نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات PCR پلی‌مورفیسم rs7903146 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. b نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات RFLP پلی‌مورفیسم rs7903146 برروی ژل آگارز ۳٪. c نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات PCR پلی‌مورفیسم rs46522 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. d نتایج مربوط به الکتروفورز محصولات RFLP پلی‌مورفیسم rs46522 برروی ژل آگارز ۳٪.

جهت ارزیابی و اطمینان از صحت نتایج به دست آمده از تکنیک PCR-RFLP تعدادی از نمونه‌ها توالی‌یابی شد. سپس داده‌های به دست آمده با استفاده از برنامه آماری SPSS نسخه ۱۶ و با به کارگیری آزمون مربع کای، آزمون کولموگروف اسمیرنوف، آزمون t برای دو نمونه مستقل و رگرسیون لاجستیک بررسی گردیدند. متغیرهای کمی به صورت میانگین و انحراف معیار و متغیرهای کیفی بصورت فراوانی و نسبت شانس ارائه گردیدند. و $p\leq$ ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

مقایسه بین افراد دو گروه بیمار و سالم، نشان می‌دهد که این افراد از نظر تعداد تفاوت معناداری ندارند (P=۰/۲۸). از نظر سنی افراد سالم مسن‌تر از افراد بیمار می‌باشند (P=۰/۰۰۲). ویژگی‌های کلینیکی و دموگرافیک هر دو گروه در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: ویژگی‌های کلینیکی افراد مورد مطالعه

متغیرها	بیمار(٪)	شاهد(٪)	P
جنسیت: زن/ مرد	۵۳/۴۷(۵۳-۴۷)	۴۳/۵۴(۴۴/۳-۵۵/۷)	۰/۲۸
سن	۵۱/۷۹±۸/۹۳	۵۶/۶۳±۷/۴۴	۰/۰۰۲
BMI, kg/m2	۲۸/۵۴±۴/۸۵	۲۶/۳۶±۴/۳۵	۰/۰۰۱
FBG, mg/Dl	۱۷۳/۷۶±۷۶/۳۷	۹۱/۳۶±۶/۵۱	۰/۰۰۰۱>
TC, mg/dL	۱۸۶/۲۶±۴۸/۰۷	۱۸۷/۵۷±۵۵/۱۸	۰/۷۲
TG, mg/dL	۱۵۳/۲۹±۵۹/۶۸	۱۳۰/۳۶±۶۳/۸۴	۰/۰۰۳

BMI: شاخص توده بدنی، FBG: قندخون ناشتا، TC: کلسترول تام، TG: تری‌گلیسرید

در مقایسه‌ی کلی دو گروه بیمار و کنترل، اختلاف معناداری در فراوانی ژنوتیپی و اللی هر دو واریانت، rs7903146 در ژن *TCF7L2* و rs46522 در ژن *UBE2Z* مشاهده نشد. بنابراین مطالعه‌ی حاضر برخلاف مطالعات انجام شده در بسیاری از جمعیت‌ها و نژادها در داخل و خارج از ایران، همراهی بین واریانت rs7903146 در ژن *TCF7L2* و rs46522 در ژن *UBE2Z* را با بیماری دیابت نوع ۲ و پارامترهای بیوشیمیایی مورد مطالعه در ارتباط با این بیماری، در جمعیت اقوام عرب ساکن خوزستان، تایید نمی‌کند. همچنین برخلاف اغلب مطالعات انجام شده در ارتباط با واریانت rs7903146، در مطالعه‌ی حاضر فراوانی بیشتری در ژنوتیپ CC و الل C (الل وحشی) در گروه بیمار و فراوانی ژنوتیپ‌های TT و TC و الل T (الل موتانت) در گروه کنترل کمی بیشتر مشاهده شد، اگرچه این اختلاف فراوانی معنادار نبود. فراوانی ژنوتیپی و اللی به دست آمده برای هر دو واریانت در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۲: فراوانی اللی و ژنوتیپی پلی‌مورفیسم‌های rs7903146 و rs46522

	ژنوتیپ/الل	کنترل	بیمار	p	OR(95%CI)
rs7903146	CC	۸ (۸/۲)	۱۴ (۱۴/۱)	۰/۲۸	۱/۷۵ (۰/۶۳-۴/۸۸)
	CT	۶۳ (۶۴/۹)	۵۹ (۵۹/۶)	۰/۸۴	۰/۹۴ (۰/۴۹ -۱/۷۹)
	TT	۲۶ (۲۶/۸)	۲۶ (۲۶/۳)	_	_
	C	۰/۴۰۷	۰/۴۳۹	۰/۴	۱/۱۴ (۰/۷۶ -۱/۷)
	T	۰/۵۹۲	۰/۵۶۰		
rs46522	CC	۲۹ (۲۹/۹)	۲۵ (۲۵/۳)	_	_
	CT	۵۴ (۵۵/۷)	۵۷ (۵۷/۶)	۰/۵۴	۱/۲۲ (۰/۶۴-۲/۳۵)
	TT	۱۴ (۱۴/۴)	۱۷ (۱۷/۲)	۰/۴۵	۱/۴۱ (۰/۵۸ -۳/۴۲)
	C	۰/۵۷۷	۰/۵۴۰	۰/۴۱	۱/۱۶ (۰/۷۸-۱/۷۳)
	T	۰/۴۲۲	۰/۴۵۹		

بحث

دیابت یکی از بحث برانگیزترین اپیدمی‌های قرن بوده و بیشترین افزایش تعداد بیمار را در کل جهان دارد (۱). بطوری که آمارها نشان می‌دهد حدود ۲۲۰ میلیون نفر در دنیا به این بیماری مبتلا هستند و تخمین زده می‌شود تعداد افراد مبتلا به دیابت در جهان تا ۲۰ سال آینده بیش از ۳۶۶ میلیون نفر خواهد شد (۲). ژن *TCF7L2* از طریق تنظیم بیان ژن هورمون‌های اینکرتین بواسطه‌ی مسیر پیام‌رسانی WNT در تنظیم ترشح انسولین نقش دارد (۸).

تحقیقات ۲۲ ساله محققین نشان داده است که پلی‌مورفیسم rs7903146 در ژن *TCF7L2* از مهم‌ترین فاکتورهای ژنتیکی است که در شیوع دیابت نوع ۲ موثر است (۲۳). مسئله‌ی قابل توجه و بررسی در مورد همراهی واریانت‌های ژن *TCF7L2* با بیماری T2DM این است که در برخی مطالعات قومیتی، همراهی متفاوتی بین دیابت نوع ۲ و لوکوس‌های مذکور دیده شده است. برای مثال (C/T rs7903146) که در اغلب جوامع بیشترین همراهی را با دیابت نوع ۲ نشان داده است، در مطالعاتی از جمله مطالعات انجام شده در جمعیت‌هایی از عربستان، و امارات متحده‌ی عربی با دیابت نوع ۲ همراهی قابل توجهی نشان نداده است و یا این‌که دو واریانت rs290487 و rs11196218 برخلاف اغلب جمعیت‌ها، در جمعیت چین، ژاپن و برزیل همراهی قابل توجه با T2DM نشان داده است (۲۴). همراهی بین rs7903146 ژن *TCF7L2* با دیابت نوع ۲ همچنین در پنج مطالعه‌ی مجزا در جمعیت‌های مختلف ایرانی بررسی شده است. در چهار مورد از این مطالعات، همراهی مثبت این واریانت با دیابت نوع ۲ و در یک مطالعه عدم همراهی آن دیده شده است. در جدول ۳ به مطالعات انجام شده روی این پلی‌مورفیسم در ایران به همراه نتایج مطالعه‌ی حاضر اشاره شده است.

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی همراهی پلی‌مورفیسم rs7903146 با T2D در تعدادی از مطالعات انجام شده.

محقق	منبع مطالعه	همراهی	قومیت	کشور	سال
Amoli	(۲۵)	+*	فارس	ایران (رفسنجان)	۲۰۱۰
Palizban	(۹)	+	فارس	ایران (اصفهان)	۲۰۱۱
Shokouhi	(۲۶)	+	کرد	ایران (ایلام)	۲۰۱۳
Mahmoudi	(۲۷)	+	فارس	گلستان	۲۰۱۳
Alami Pourahmadi	(۱۲)	_**	فارس	ایران (جهرم)	۲۰۱۵
Shafidelpour	مطالعه کنونی	_	عرب	ایران (خوزستان)	۲۰۱۵

اختصارات: *همراهی معنی‌دار، **عدم همراهی.

یکی از لوکوس‌های تحت تاثیر *TCF7L2* که همراهی آن با دیابت نوع ۲ اخیرا مشخص شده است، لوکوس در بردارنده‌ی ژن *UBE2Z* می‌باشد. در سال ۲۰۱۴ Johnson و همکاران با تلفیق اطلاعات به دست آمده از بررسی جایگاه‌های اتصال فاکتور رونویسی TCF7L2 در چندین رده‌ی سلولی و همچنین نتایج حاصل از مطالعات GWAS، در بررسی ارتباط rs46522 ژن*UBE2Z* با CAD، این پلی‌موفیسم را برای اولین بار، مرتبط با دیابت نوع ۲ معرفی کرد (۱۸). همانطور که اشاره شد، دیابت یک بیماری چند عاملی است که بروز آن تحت تاثیر عوامل مختلف ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و محیطی قرار دارد. مطالعه‌ی نقش عوامل ژنتیکی در بروز دیابت بسیار گسترده و پیچیده است. چرا که تحلیل این بیماری از نظر ژنتیکی علاوه بر شناسایی، مطالعه و

تخمین سهم اثر ژن‌های مختلف دخیل در این بیماری و واریانت‌های موجود در آن‌ها، نیازمند شناسایی و درک میانکنش‌های بین این ژن‌ها و واریانت‌ها و همچنین اثرات تجمعی آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این مسائلی مانند: تاثیرات اپی‌ژنتیک، مطالعه‌ی این واریانت‌ها در گروه‌های هاپلوتایپی، تفاوت‌های نژادی (نقش و اثر متفاوت واریانت‌های ژنتیکی موجود در جمعیت‌های نژادی مختلف)، نقش عوامل محیطی و سبک زندگی (از جمله: سابقه‌ی دیابت مادر در دوره‌ی بارداری، سبک زندگی بسیار مدرن و همراه با عدم فعالیت فیزیکی، چاقی در بزرگسالان، رژیم غذایی پرکالری و افزایش جذب غذا، فاکتورهای استرس زای روانی-اجتماعی و ...)، اندازه‌ی جمعیت مورد بررسی در مطالعه، معیار و روش انتخاب و تهیه‌ی نمونه‌ها و روش تعیین ژنوتیپ و تحلیل‌های آماری عوامل دیگری هستند که بر پیچیدگی این مطالعات می‌افزایند. لذا عوامل ذکر شده می‌توانند تفاوت و تنوع موجود در نتایج مطالعات ذکر شده و مطالعه‌ی حاضر را توجیه نماید. چرا که از طرفی عوامل محیطی حاکم بر جمعیت، نژاد، اندازه‌ی جمعیت، روش جمع‌آوری نمونه و ... در مطالعات مختلف متفاوت بوده و از طرفی دیگر اطلاعات کافی در مورد اثر عوامل محیطی و اپی‌ژنتیکی موثر بر فعالیت ژن *TCF7L2* و *UBE2Z* در دسترس نمی‌باشد. افزایش اندازه‌ی نمونه در چنین مطالعاتی، بررسی این واریانت‌ها به همراه واریانت‌های دیگر این ژن‌ها در گروه‌های هاپلوتایپی، دست‌یابی به اطلاعات بیشتر در مورد مکانیسم‌های مولکولی مربوط به عملکرد این واریانت‌ها و برهم کنش‌های بین‌ژنی و عوامل اپی‌ژنتیک دخیل، از جمله عواملی هستند که می‌توانند ما را در تفسیر و توجیه یا تایید و رد نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه یاری نمایند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی هر دو واریانت تفاوت معناداری بین فراوانی ژنوتیپی و اللی گروه کنترل و بیمار مشاهده نشد. بنابراین این مطالعه همراهی واریانت‌های *UBE2Z* rs46522 و rs790314 *TCF7L2* را با دیابت نوع دو در قومیت عرب ساکن استان خوزستان تایید نمی‌کند.

قدردانی

بدین وسیله از همکاری و راهنمایی بخش آزمایشگاه بیمارستان ولیعصر خرمشهر و درمانگاه فوق تخصصی بیمارستان گلستان اهواز سپاسگزاری می‌شود. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه به شماره ۹۵۱۰۲۹۲ می‌باشد که با پشتیبانی مالی بخش پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به ثمر رسیده است.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی شامل این مطالعه نمی‌شود.

منابع مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه به شماره ۹۵۱۰۲۹۲ می‌باشد که با پشتیبانی مالی بخش پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است.

منافع متقابل

مولف اظهار می‌دارد منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

س.ش و ع. م.ف و همکاران محترم م.ذ و م.پ.ب طراحی، اجرا و تحلیل نتایج این مطالعه را بر عهده داشته و همچنین نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید نموده‌اند.

References

1. Freeman H, Cox R D. Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. *Human molecular genetics* 2006; **15**: R202-209. doi: 10.1093/hmg/ddl191
2. Clarke D M, Baird D E, Perera D N, Hagger V L, Teede H J. The INSPIRED study: a randomised controlled trial of the Whole Person Model of disease self-management for people with type 2 diabetes. *BMC public health* 2014; **14**(1): 134.
3. Hadaegh F, Bozorgmanesh M R, Ghasemi A, Harati H, Saadat N, Azizi F. High prevalence of undiagnosed diabetes and abnormal glucose tolerance in the Iranian urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. *BMC public health* 2008; **8**(1): 176. doi: 10.1186/1471-2458-8-176
4. Sicree R, Shaw J, Zimmet P, Heart B I. The global burden. *Diabetes and impaired glucose tolerance Baker IDI Heart and Diabetes Institute* 2010. doi: 10.1016/j.diabres.2009.10.007
5. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2015 abridged for primary care providers. *Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association* 2015; **33**(2): 97. doi: 10.2337/diaclin.33.2.97
6. Moskani G. Firuzjaee and Sattar, Incertin, The new family of anti-diabetes drugs. *Journal of Army Medical Paramedical School* 2012; **5**.
7. Nolan C J, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to

prevention and management. *The Lancet* 2011; **378**(9786): 169-181. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60614-4

8. Barros C M, Araujo-Neto A P, Lopes T R, Barros M A, Motta F J, Canalle R, et al. Association of the rs7903146 and rs12255372 polymorphisms in the TCF7L2 gene with type 2 diabetes in a population from northeastern Brazil. *Genet Mol Res* 2014; **13**(3): 7889-7898. doi: 10.4238/2014.September.29.1
9. Palizban A, Nikpour M, Salehi R, Maracy M R. Association of a common variant in TCF7L2 gene with type 2 diabetes mellitus in a Persian population. *Clinical and experimental medicine* 2012; **12**(2): 115-119. doi: 10.1007/s10238-011-0144-7
10. Acharya S, Al-Elq A, Al-Nafaie A, Muzaheed M, Al-Ali A. Type 2 diabetes mellitus susceptibility gene TCF7L2 is strongly associated with hyperglycemia in the Saudi Arabia Population of the eastern province of Saudi Arabia. *Eur Rev Med Pharmacology Sci* 2015; **19**(16): 3100-3106. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0005
11. Alsmadi O, Al-Rubeaan K, Mohamed G, Alkayal F, Al-Saud H, Al-Saud NA, et al. Weak or no association of TCF7L2 variants with Type 2 diabetes risk in an Arab population. *BMC medical genetics* 2008; **9**(1): 72. doi: 10.1186/1471-2350-9-72
12. Pourahmadi M, Erfanian S, Moradzadeh M, Jahromi A S. Non-association between rs7903146 and rs12255372 polymorphisms in transcription factor 7-like 2 gene and type 2 diabetes mellitus in Jahrom City, Iran. *Diabetes & metabolism journal* 2015; **39**(6): 512-517. doi: 10.4093/dmj.2015.39.6.512
13. Scott L J, Bonnycastle L L, Willer C J, Sprau A G, Jackson A U, Narisu N, et al. Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes* 2006; **55**(9): 2649-2653. doi: 10.2337/db06-0341
14. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 2007; **50**(4): 747-751. doi: 10.1007/s00125-006-0588-6
15. Loos R J, Franks P W, Francis R W, Barroso I, Gribble F M, Savage D B, et al. TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and β-cell function in a British Europid population. *Diabetes* 2007; **56**(7): 1943-1947. doi: 10.2337/db07-0055
16. Stolerman E S, Manning A K, McAteer J B, Fox C S, Dupuis J, Meigs JB, et al. TCF7L2 variants are associated with increased proinsulin/insulin ratios but not obesity traits in the Framingham Heart Study. *Diabetologia* 2009; **52**(4): 614-620. doi: 10.1007/s00125-009-1266-2
17. Suguna S A, Nandal D, Kamble S, Bharatha A, Kunkulol R. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *Int J pharm pharm sci* 2014; **6**: 198-199.
18. Johnson M E, Zhao J, Schug J, Deliard S, Xia Q, Guy V C, et al. Two novel type 2 diabetes loci revealed through integration of TCF7L2 DNA occupancy and SNP association data. *BMJ Open Diabetes Research and Care* 2014; **2**(1): 52. doi: 10.1136/bmjdrc-2014-000052
19. Gu X, Zhao F, Zheng M, Fei X, Chen X, Huang S, et al. Cloning and characterization of a gene encoding the human putative ubiquitin conjugating enzyme E2Z (UBE2Z). *Molecular biology reports* 2007; **34**(3): 183-188. doi: 10.1007/s11033-006-9033-7
20. Schunkert H, König I R, Kathiresan S, Reilly M P, Assimes T L, Holm H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature genetics* 2011; **43**(4): 333. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960443
21. Erbilgin A. Identification of CAD candidate genes in GWAS loci and their expression in vascular cells. *Journal of lipid research* 2013; **54**(7): 1894-1905. doi: 10.1194/jlr.M037085
22. Daneshpour M S, Sedaghatikhayat B, Hedayati M, Azizi F. from genome to gene: a review of genes and genetic variations to be associated with metabolic syndrome. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2015; **14**(4): 225-234. doi: 10.1530/endoabs.37.EP606
23. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation* 2007; **117**(8): 2155-2163. doi: 10.1172/JCI30706.
24. Peng S, Zhu Y, Lü B, Xu F, Li X, Lai M. TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes risk: a comprehensive and updated meta-analysis involving 121 174 subjects. *Mutagenesis* 2012; **28**(1): 25-37. doi: 10.1093/mutage/ges048
25. Amoli M M, Amiri P, Tavakkoly-Bazzaz J, Charmchi E, Hafeziyeh J, Keramatipour M, et al. Replication of TCF7L2 rs7903146 association with type 2 diabetes in an Iranian population. *Genetics and molecular biology* 2010; **33**(3): 449-451. doi: 10.1590/S1415-47572010005000056.
26. Shokouhi S, Delpisheh A, Haghani K, Mahdizadeh M, Bakhtiyari S. Association of rs7903146, rs12255372, and rs290487 polymorphisms in TCF7L2 gene with type 2 diabetes in an Iranian Kurdish ethnic group. *Clin Lab* 2014. doi: 10.7754/Clin.Lab.2013.130809
27. Alami F M, Samaei N M, Ahmadi M, Tabarraei A, Khosravi A, Tabatabaiefar M A, et al. Association of transcription factor 7-like 2 (Tcf7l2) gene haplotypes with the risk of type 2 diabetes mellitus in Iran. *Advances in Biological Research* 2013; **7**(5): 145-150. doi: 10.1590/S1415-47572012005000029