الارتقاء بالبحوث العلمية طريقنا لخدمة المجتمع

تأثير مستويات الابلين والتعدد الشكلي لجينه rs2235306 في المرضى المصابين بالسكري النوع الثاني

ريم أديب محمد[1] ، زيد محمد مبارك المهداوي[2] ، عقيل حسين العاصي[2]

[1]قسم طب الأسنان ، جامعة الكتاب ، كركوك ، العراق

[2]قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

معلومات البحث

الكلمات المفتاحية: مرض السكر، الابلين ، مستقبلات الابلين ، السكر التراكمي .

الاسم: ريم أديب محمد

البريد الاليكتروني:

رقم الهاتف:

الملخص

اجريت هذه الدراسة في مستشفى تكريت العام – وحدة الانعاش المركزي في مدينة تكريت . وتم تحديد مستويات الابلين في الاشخاص المصابين بالسكري والسليمين ،صنفت العينات الى مجموعتين مجموعة مرضى ومجموعة اصحاء وقسم الدم الى ثلاث مجاميع :المجموعة الاولى : اخذ منه مصل الدم وحفظ في انابيب اختبار لغرض لغرض اجراء فحص الابلين والسكري ،المجموعة الثانية تم وضع الدم في انابيب حاويه على مادة حافظة لغرض استخلاص الDNA واجراء الاختبارات الجزيئية علية ،المجموعة الثالثة تم اخذ 1مل من الدم ووضعة في انابيب مانعة للتخثر لغرض اجراء تحديد تركيز السكر التراكمي ،اظهرت النتائج وجود فروق معنوية عالية($p<0.01$) في تركيز الابلين بين المرضى والسيطرة ،اما نتائج الجينات اظهرت وجود فروق معنويه ($P<0.01$) بين TT و TC و CC وعلاقتها بالسكري من خلال النتائج تبين وجود علاقة بين تركيز الابلين والتعدد الشكلي للابلين وتأثيرها على تطور مرض السكري النوع الثاني بالاضافة الى حصول تباينات في التعدد الشكلي للابلين في الاشخاص المصابين بمرض السكر .

المقدمة

الابلين هو ببتيد مكون من 36 حامضا امينيا يرتبط بمستقبلات APJ G-protein-coupled receptor (1)، تم التعرف علية في مجموعة متنوعة من الانسجة من ضمنها الجهاز العصبي المركزي. يكون تركيز الابلين في الدم حوالي (0.2-1.5 ng/m)، يمكن ان يعد الابلين هرمون وتزداد مستوياته في الدم بفعل الانسولين خاصة عند الاشخاص المصابين بالبدانه(2)، هنالك عدة اشكال للابلين وهي (apelin-36, apelin-17, apelin-13) كما يشترك الابلين في تنظيم ايض العظم، يقوم الابلين بحماية القلب ضد الاصابة بنقص التروية ويقلل من حجم احتشاء العضلة القلبية (3). يتم كبح تعبير الابلين في الخلايا الدهنية عند الامتناع عن تناول الطعام (الصيام) وعند تناول الغذاء يعود للتعبير من جديد كما ترتفع مستويات الابلين في الاشخاص المصابين بالسمنة (Fasshauer M *et al* ., 2002) و ومقاومة الانسولين والتليف الكبدي(4). جين الابلين هو جين يشفر لببتيد الابلين يجند ذاتياً لمستقبل G-protein coupled receptor APJ (Tatemoto K *et al*.,1998) يقع على X chromosome (Xq25-26.1) ويحتوي على 3 exons مع منطقة الترميز التي تغطي exon 1 و 2. ، يشفر جين الابلين 77حامض امينيي لprepropeptide والذي يتضمن apelin-36, apelin-17, and apelin-13 الذي يفعل مشتقبل APJ ان نظام apelin–APJ System له تمثيل واسع في الجهاز العصبي المركزي وفي مجموعة متنوعه من الانسجة مثل الرئتين والقلب والكليتين والاوعية الدموية والتخليق الجنيني حيث يعمل كمنظم لتوازن القلب والاوعية الدموية، وهو يحفز الانقباض دون تحفيز البطين(3) ، له تأثيرات مدرة للبول وهو بذلك يشابه عمل الفاسوبرسين. ان عملية تنظيم التعبير الجيني للأبلين يتوسطها العديد من المؤثرات مع تداخل عوامل نسخ عدة ،اجريت دراسات SNP اشارت الى وجود دور محتمل لل SP1في تنظيم تعبير الابلين وبالإضافة الى ذلك اشارت دراسات اخرى الى ان السايتوكين لTNFα قد يقوم بتحفيز تعبير الابلين ض phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K), c-Jun N-د terminal kinase (JNK) and MEK1/2 (8)في الخلايا الدهنية

وذكرت دراسات اخرى الى ان نقص الاوكسجين يعمل على تنظيم تعبير الابلين في الخلايا القلبية كما يقوم العامل المحفز لنقص الاوكسجين(5) hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α)بتحفيز تعبير الابلين في الخلايا الشحمية هذه الدراسات تؤكد الى ان الابلين قد يلعب دوراً مهما في الاستجابة المتوازنة لمستويات الاوكسجين المنخفض كما ثبت ان الانسولين يزيد من تعبير الا Apelin في الخلايا الشحمية-PI3K, protein kinase C (PKC), mitogen activated and ERK kinase (MAPK) 1(6)كما اكدت دراسات اخرى الى ان الالدوستيرون يقلل من تعبير الابلين في الخلايا الشحمية عبر مسار الP38 بالاضافة الى ان مستقبل peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1α ينظم تعبير الابلين مما يؤكد الى ان للابلين دوراً مهما في ايض الطاقة .اما بالنسبة للسكري فأن الghrelin يقوم بتقليل تخليق الابلين واطلاقة (7)(8) تهدف الدراسة الحالية الى معرفة نوع العلاقة بين مستويات الابلين والتعدد الشكلي للابلين وبين مستويات السكر والسكر التراكمي لدى الاشخاص المصابين بالسكر النوع الثاني .

طرائق العمل

تم جمع العينات من العيادات الخارجية المسائية في مدينة تكريت خلال الفترة بين تموز الى أيلول 2017 وشملت الدراسة على 80 مريض ومريضه من الاشخاص المصابين بالسكري النوع الثاني تراوحت اعمارهم ما بين (40–90) سنة بعد التأكد من حالتهم من خلال الفحوص المختبرية والاطباء المختصين . فضلا عن اختيار مجموعة عشوائية ضمت (30) من الاشخاص السليمين غير المصابين بالسكري تراوحت اعمارهم ما بين (40–90) قسمت العينات المدروسة الى مجموعتين: المجموعة الاولى: شملت على الاشخاص المصابين بالسكري النوع الثاني، المجموعة الثانية: شملت على الاشخاص السليمين الغير مصابين بالسكري .سحب 5 مليلتر من الدم وقسم لثلاث اقسام: القسم الاول: تم عزل مصل الدم لغرض اجراء الفحوص الكيميائية عليه، القسم الثاني :حفظ الدم بمحلول خاص (ACDS) لغرض عزل الDNA منه لأجراء الاختبارات الجزيئية. وحفظت العينات بدرجه حرارة (-8) بالتجميد الفائق، –القسم الثالث وضع 1مل من الدم في انابيب حاويه على ماده مانعه للتخثر EDTA لغرض اجراء فحص الHbA1c بصورة مباشر بعد عملية السحب. تم قياس تركيز الابلين باتباع الخطوات المترافقة مع عدة الفحص المجهزة الخاصة به وحسب تعليمات الشركة المصنعة التي تحمل الرقم المتسلسل (SL0277Hu)Sun.

الاختبارات الجزيئية

تم اجراء الدراسة الجزيئية والتي شملت على مايلي :– استخلاص الدنا DNA من الدم وقياس نقاوته وتركيزه، استعمال الPCR لتحديد التعدد الشكلي لجينات الابلين.

استخلاص DNA: تم الاعتماد على طريقة Bartlett & White (2003), في استخلاص الدنا المجيني من عينات الدم التي تم حفظها بمحلول ACDS.

التعدد الشكلي للابلين: وجد التعدد الشكلي لجين الابلين من خلال استخدام تفاعل البلمرة التسلسلي (T-ARMS-PCR). حيث تضاعفت قطعة الجين المراد دراستها بأستعمال بادئات متخصصه كما موضح:–

Forward inner (T allele)
CCCCCTGCACACCATCTGCTT
Reverse inner (C allele)
GGGACAGGGATCTAGATGCAGGAAG
Forward outer
AAGTGGTGCAGGGTATCCTTGGGT
Reverse outer
AAGGAGCCAAGGAAGGAACAGAGC

لتضخيم قطعة الDNA البالغ حجمها 458 bp للحزمه الرئيسية و 295 bpللاليل C و 208 bp للاليل T ،تم تحضير التفاعل بناتج نهائي 20µl ويتضمن 4µ من الدنا المجين(100ng/lL_) و1µl من كل برايمر (10 pmol/lL)

وكمل الحجم بأضافة 12µ من الماء المقطر، طبقت تفاعلات الPCR باستعمال البرنامج التالي:

المرحلة	درجة الحرارة	الزمن (الدقيقة)	عدد الدورات
المسخ الاولي	95	5m	1
المسخ	95	30 s	35
ارتباط البادئ	58	30 s	
الاستطالة	72	60 s	
الاستطالة النهائيه	72	10 m	1

بعدها تم ترحيل ناتج التفاعل على هلام الاكاروز بتركيز 2% وصيغت بصبغة الايثيديوم بروميد وثم صورت بجهاز E-Graph .

النتائج

اظهرت النتائج وجود فروق معنويه عند مستوى معنوي $p<0.01$ في مستويات الابلين بين مجموعة السيطرة ومجموعة المرضى ،ووجود فروق عالية المعنوية في مستويات السكر بين مجموعة السيطرة ومجموعة المصابين ، ووجود فروق عالية المعنوية ($P<0.05$) في مستويات السكر التراكمي بين مجموعة السيطرة ومجموعة المصابين، اما النتائج الجزيئيه فقد اشارت الى ارتباط معنوي($p<0.01$) بين التركيب الوراثي CCوالتركيب الوراثي TC مع مستويات الابلين ومستويات السكر في الدم لدى الاشخاص المصابين وكما موضح بالجداول الآتية:

جدول (1) يبين العلاقة بين الاصحاء والمرضى

Parameters	Control M±SD	Patient M±SD
Apelin	0.30±0.25	0.66±0.53
RBS	105±17.8	231±53.7
HBA1C	4±1.2	8.3±1.4

جدول (2) المقارنة بين TTوالTc وعلاقتهم بالسكري

Parameters	TT M±SD	Tc M±SD
Apelin	0.44±0.22	0.40±0.28
RBS	198±81	192±94
HBA1C	7±1	6±2

جدول (3) المقارنة بين TTوالcc وعلاقتهم بالسكري

Parameters	TT M±SD	cc M±SD
Apelin	0.44±0.22	0.68±0.52
RBS	198±81	214±65
HBA1C	7±1	7.8±1.4

جدول (4) المقارنة بين cc والTc وعلاقتهم بالسكري

Parameters	Tc M±SD	cc M±SD
Apelin	0.40±0.28	0.68±0.52
RBS	192±94	214±65
HBA1C	6±2	7.8±1.4

المناقشة

في الدراسة الحالية وجدنا ان تراكيز الابلين مرتبطة ارتباط معنوي مع الزيادة في تراكيز السكر لدى المصابين بالسكري النوع الثاني ،هذا الارتباط يشير الى ان الاشخاص المصابين بالسكري يعانون من السمنة حيث ذكرت العديد من الابحاث ان الاشخاص الصابين بالبدانة يمتلكون مستويات عالية من الابلين وكذلك يعانون من ارتفاع ضغط الدم وهذا امر طبيعي لان الابلين يؤثر على ضغط الدم من خلال تأثيره على قطر الأوعية الدموية (11)، وبما ان الأشخاص المصابين بالسكري يعانون من اضطرابات ايضيه تمنع تحويل الغذاء المتناول الى طاقة كي يستفيد الجسم منها وهذه الاضطرابات ناتجه من حصول خلل في عمل الانسولين(13).ففي الحالات الطبيعية عند تناول الغذاء تتحول الكاربوهيدات الى سكر وهو سكر الكلوكوز الذي ينقله الدم الى خلايا الجسم كافة من اجل الاستفادة منه وانتاج الطاقة وتحتاج الخلايا (خلايا الجسم) الى وجود تراكيز كافية من الانسولين للسماح بالكلوكوز بالدخول الى داخل الخلايا بالإضافة الى ذلك يقوم الانسولين بتنظيم افراز الابلين بتراكيز مرتفعة من خلال ارسال اشارات خلويه الى مستقبلات الابلين الواقعة على اسطح الخلايا فتقوم بتحرير كميات كافيه من الابلين (5)(10)، بحيث تعمل هذه التراكيز مع الانسولين في المحافظة على مستويات الكلوكوز الداخل الى داخل الخلايا ،اما في الحالة المرضية فعند تناول غذاء غني بالسكريات فأن كلاً من الكبد والبنكرياس يكونان غير قادرين على انتاج كميات مناسبه من الانسولين للسماح للكلوكوز بالدخول الى داخل الخلايا وكذلك تصبح تراكيز الابلين قليله وهذه التراكيز القليلة تبقي جزء من الكلوكوز في مجرى الدم مسببه ارتفاعا في مستويات الكلوكوز(4)، اكدت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنويه عالية في تراكيز السكر والسكر التراكمي بين مجموعة السيطرة ومجموعة المصابين، اما نتائج الجينية فقد اظهرت نتائج الترحيل لناتج الpcr ثلاث انواع من الطرز الوراثية وهي TT و TC و CC، اظهرت النتائج الى عدم وجود فروق معنويه بين مستويات السكر والابلين لدى الاشخاص الذين يمتلكون الطراز الوراثي TT لجين الابلين وهذا يشير الى ان تواجد هذا الطراز الوراثي لايؤثر على مستويات السكر والابلين ،اما الطراز الوراثي TC لجين الابلين فلا يوجد فرق معنوي بين مستويات الابلين والسكر ،اما الطراز الوراثي CC اكدت النتائج وجود فروق معنويه عالية في تراكيز الابلين والسكر وهذا يدل على ان الاشخاص الذين يمتلكون الطراز الوراثي cc لجين الابلين هم اكثر عرضه للإصابة بالسكري النوع الثاني حيث تواجد هذا النوع من الطرز الوراثية يساعد على احداث مرض السكري (9)،هذه النتائج تشير الى ان التعدد الشكلي لجين الابلين له تأثير كبير على تطور مرش السكري وكذلك يظهر لنا الاستعداد الوراثي للشخص للإصابة بالسكري النوع الثاني. من خلال نتائج الدراسة الحالية نجد يرتبط التعدد الشكلي لجين الابلينrs2235306 مع النمط المظهري للسكري ومستويات السكر التراكمي وهذا الارتباط من شأنه ان يساعدنا في امكانية الكشف المبكر عن مرض السكري النوع الثاني وامكانيه اتخاذ الاجراءات الضرورية لمنع تطور مرض السكري من خلال زيادة تراكيز الابلين بصورة عالية وتصحيح النظام الغذائي للأشخاص الذين يمتلكون مستويات سكر عالية.

المصادر

1-Andersen, C. U.; Hilberg,O.; Mellemkjaer, S., Nielsen-Kudsk J. E; and Simonsen, U. (2011). *Apelin and pulmonary hypertension. Pulmonary circulation* **1**, 334–346, doi: 10.4103/2045-8932.87299.

2-Chen, L. J.; Xu, R.; Yu, H. M.; Chang, Q. and Zhong, J. C. **(2015)***.The ACE2/Apelin Signaling, MicroRNAs, and Hypertension. International journal of hypertension*, 896861, doi: 10.1155/2015/896861 .

3-Scimia, M. C. *et al.* (2012).*APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. Nature* **488**, 394–398, doi: 10.1038/nature11263

4-Barnes, G.; Japp, A. G. and Newby, D. E. (2010).*Translational promise of the apelin-APJ system. Heart* **96**, 1011–1016, doi: 10.1136/hrt.2009.191122

5-O′Carroll, A. M.; Lolait, S. J.; Harris, L. E. and Pope, G. R. (2013).*The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. The Journal of endocrinology* **219**, R13–35, doi: 10.1530/JOE-13-0227

6-Castan-Laurell, I.; Dray, C., Knauf, C.; Kunduzova, O. and Valet, P. (2012).*Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**, 234–241, doi: 10.1016/j.tem.2012.02.005

7-Chen, X.; Bai, B.; Tian, Y., Du, H. and Chen, J. (2014). *Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased*

signaling. *The Journal of biological chemistry* **289**, 31173–31187, doi: 10.1074/jbc.M114.574020
8-Bai, B.and.. *et al.* (2014).*Heterodimerization of human apelin and bradykinin 1 receptors: novel signal transduction characteristics*. *Cellular signalling* **26**, 1549–1559, doi:10.1016/j.cellsig.2014.03.022
9-Li, Y.and.. *et al.* (2012).*Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction*. *Cellular signalling* **24**, 991–1001, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.012.
10-Bai, B.; Cai, X., Jiang; Y.; Karteris, E. and Chen, J. (2014). *Heterodimerization of apelin receptor and neurotensin receptor 1 induces phosphorylation of ERK(1/2) and cell proliferation via Galphaq-mediated mechanism*. *Journal of cellular and molecular medicine* **18**, 2071–2081, doi: 10.1111/jcmm.12404
11-Abd-Elbaky, A.E.; Abo-El Matty, D.M.; Mesbah, N.M. and Ibrahim, S.M. (2015). Associations of Serum Omentin and Apelin Concentrations with Obesity, Diabetes Mellitus Type 2 and Cardiovascular Diseases in Egyptian Population. Endocrinology and Metabolic Syndrome. **4(2),** 1-6. doi:10.4172/2161-1017.1000171.
12-El-mesallamy، H.; Suwailem S.; Seleem M., (2013). Visfatin and Apelin are New Interrelated Adipokines Playing Role in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus Associated Coronary Artery Disease in Postmenopausal Women. International Journal of Medical, Health, Biomedical and Pharmaceutical Engineering. **7(12)**: 447–452.
13-Freitas Lima، L.C.; Braga، V.A.; Silva، M. S. F.; Cruz، J.C.; Santos، S.H.S.; Monteiro، M. M. O.and et al. (2015). Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. Frontiers in Physiology. **6,** 1-15. doi: 10.3389/fphys.2015.00304.

Efected of Apelin protein levels and it's polymorphism rs2235306in type 2diabetes

Reem A.Mohammed[1] , Zaid M. Mohammed Almahdawi[2] , Akeel H. AL-Assie[2]
[1] *Department of Dentistry ,University of Alkeetab , Kirkuk, Iraq*
[2] *Department of Biology , College of Science , University of Tikrit , Tikrit , Iraq*

Abstract
The study was conducted at Tikrit General Hospital Specifically in the ICU, Where serum Apelin and suger levels had been determined in patients with diabetes. The samples were divided into three groups.Part of the blood samples was preserved with a special conservation solution for the purpose of isolating the DNA. The results showed asignificant increase P <0.01 in Apelin concentration in patients compared to normal subjects:. The results of the genetic study showed a significant differences P <0.01 in Apelin concentrations and Apelin polymorphism rs2235306 in diabetes type II patients.