مقایسه میزان متیلاسیون DNA ژن‌های CDKN2A و CDKN2B زنان مبتلا و غیرمبتلا به دیابت بارداری

نجمه شایق[۱]، دکتر مسعود گلعلی‌پور[۲]، دکتر محمدجعفر گلعلی‌پور[۳*]

۱. کارشناس ارشد علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۲. دانشیار گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی سلولی مولکولی گرگان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۳. استاد گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات ناهنجاری‌های مادرزادی گرگان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۰۵/۱۰

خلاصه

مقدمه: دیابت، یکی از بیماری‌های متابولیک است که با هایپرگلیسمی و اختلال در هومئوستازی گلوکز مشخص می‌شود. متیلاسیون ژن، یکی از مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک است که خاموش شدن ژن موردنظر را به‌دنبال دارد. ژن‌های CDKN2A و CDKN2B با دیابت بارداری مرتبط هستند. مطالعه حاضر با هدف مقایسه میزان متیلاسیون DNA ژن‌های CDKN2A و CDKN2B زنان مبتلا و غیرمبتلا به دیابت بارداری انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مورد- شاهدی در طی سال ۱۳۹۹ بر روی ۴۸ زن باردار در محدوده سنی ۳۵-۱۸ سال در هفته ۲۸-۲۴ بارداری شامل ۲۴ زن باردار مبتلا به دیابت بارداری (گروه مورد) و ۲۴ زن غیرمبتلا به دیابت بارداری (گروه شاهد) مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی شهید صیاد شیرازی گرگان انجام شد. پس از استخراج DNA از خون میتلاسیون ژن‌های اشاره شده با روش Bisulfite sequencing پرداخته و سپس قطعه ژنی مورد نظر توالی‌یابی گردید و تعداد CPGهای متیله و غیرمتیله آنالیز گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون تی دانشجویی انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میانگین درصد میتلاسیون ژن CDKN2A در گروه مورد (۱۹/۷۹±۲/۰۷) کمتر از گروه شاهد (۳۳/۵۴±۲/۵۴) بود (p<۰/۰۵). همچنین میانگین درصد متیلاسیون ژن CDKN2B در گروه مورد (۲۹/۹۱±۲/۸۵) کمتر از گروه شاهد (۴۵/۴۵±۲/۹۸) بود (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان‌دهنده پایین‌تر بودن مقادیر متیلاسیون ژن‌های CDKN2A و CDKN2B در زنان مبتلا به دیابت بارداری در مقایسه با زنان غیرمبتلا به دیابت بارداری بود.

کلمات کلیدی: اپی‌ژنوم، دیابت بارداری، متیلاسیون DNA

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر محمد جعفر گلعلی‌پور؛ مرکز تحقیقات ناهنجاری‌های مادرزادی گرگان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. **تلفن:** ۰۱۷-۳۲۴۵۱۶۵۳؛ **پست الکترونیک:** mjgolalipour@yahoo.com

مقدمه

دیابت، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و همچنین بزرگ‌ترین مشکل بهداشتی در همه کشورها است؛ به‌طوری‌که سازمان سلامت جهان از آن به‌عنوان اپیدمی خاموش نامبرده است (۱). دیابت بارداری (GDM)[1] اصلی‌ترین اختلال متابولیکی دوران بارداری است که در سال‌های اخیر روند رو به رشد از منظر شیوع داشته است (۲). دیابت بارداری به اختلال متابولیکی گفته می‌شود که به‌دلیل عدم تحمل کربوهیدرات‌ها طی بارداری ایجاد یا برای اولین بار تشخیص داده می‌شود که منجر به افزایش گلوکز خون می‌گردد. این اختلال زمانی رخ می‌دهد که حداکثر ترشح انسولین بدن مادر باردار نتواند با مقاومت انسولین بدن وی تطابق پیدا کند. به‌دنبال چنین رخدادی، مادر و جنین هر دو در معرض افزایش قندخون (هیپرگلیسمی) هستند که خود منجر به آسیب‌هایی نظیر افزایش پرفشاری خون و مسمومیت بارداری در مادر و افت قندخون جنینی می‌گردد (۲).

مکانیسم دقیق ایجاد دیابت بارداری کاملاً مشخص نیست. با این‌حال، تخمین زده می‌شود که زنان مبتلا به دیابت بارداری قادر به تأمین تقاضای روزافزون برای تولید انسولین در دوران بارداری نیستند. زنان مبتلا به دیابت بارداری در معرض خطر پره‌اکلامپسی، سزارین و آسیب‌دیدگی هنگام زایمان هستند، در حالی‌که عوارض پس از زایمان برای فرزندان شامل ماکروزومی، دیستوشی شانه، هایپرینسولینمی، هیپوگلیسمی و هایپربیلیروبینمی است. همچنین در درازمدت، مادران و فرزندان آنها مستعد ابتلاء به شرایط متابولیکی مانند چاقی، دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی - عروقی هستند. برآوردها نشان می‌دهند که تقریباً ۳۰٪ از فرزندان و بیش از ۷۰٪ از زنان با سابقه ابتلاء به دیابت بارداری، مستعد ابتلاء به دیابت نوع ۲ در اواخر زندگی خود هستند. بنابراین مشکلات بهداشتی و اقتصادی قابل توجهی برای سیستم بهداشتی به همراه دارند (۳). شناخت عوامل ژنتیکی زمینه‌ای دیابت بارداری به محققین کمک می‌کند تا دانش مکانیسم پاتوفیزیولوژیک بیماری را کسب نمایند. تا به امروز، اساس ژنتیکی دیابت بارداری و اهمیت بالینی بالقوه آن به‌خوبی شناخته نشده است. این بررسی بر یافته‌های مطالعات ژنتیکی در مورد دیابت بارداری متمرکز است (۴). اپی‌ژنتیک، مسأله مهمی است که امروزه به‌عنوان یکی از مسیرهای کنترل بیان ژن معرفی شده و به تغییر در بیان ژن بدون تغییر پایه در توالی DNA اطلاق می‌گردد که این تغییرات می‌توانند به نسل بعد منتقل شوند. حداقل سه شاخه مجزا شامل متیلاسیون DNA، اصلاحات هیستون و سازوکارها بر پایه RNA وجود دارند که به‌وسیله آنها اصلاحات اپی‌ژنتیکی می‌تواند صورت گیرد (۵، ۶). شواهد مربوط به حساسیت ژنتیکی و تنظیم اپی‌ژنتیک نامنظم، به‌ویژه متیلاسیون DNA و miRNAها، به‌طور فزاینده‌ای در طول دیابت بارداری گزارش می‌شوند که باعث علاقه به استفاده از آنها به‌عنوان نشانگرهای زیستی مولکولی شده است (۳). مطالعات گسترده ارتباط ژن‌ها (GWA)[2] و متاآنالیز منجر به شناسایی انواع مختلف T2DM مرتبط شده است. انواع ژنتیکی مانند CDKAL1، رمزگذار پروتئینی با عملکرد ناشناخته، اما دارای همسانی توالی بالا با پروتئین‌های تنظیم‌کننده کیناز ۵ و دو ژن درگیر در تنظیم چرخه سلولی شامل CDKN2A و CDKN2B شواهد زیادی در رابطه با دیابت بارداری در جمعیت کره نشان داده است (۴). پژوهش‌های قبلی نشانگر آن است که تغییرات متمایز سطح بالای بیان ژن‌ها با پایین بودن سطح پیش‌برنده متیلاسیون قبل از بروز دیابت بارداری همبستگی دارد (۷). اگرچه ارتباط بین دیابت بارداری و تغییرات اپی‌ژنیک و پروفایل ژنومی ژن‌های درگیر مطالعه شده است؛ ولی تغییرات دورنمای مولکولی سطح مسیر ژنی طی دیابت بارداری هنوز مستلزم مطالعه بیشتری بوده و ناشناخته است. مسیر متیلاسیون ژن‌های مختلف و نقش آن در بروز دیابت حاملگی، مستلزم تحقیق و بررسی بیشتر و شناسایی ژن‌های درگیر در آن است (۸). لذا مطالعه حاضر با هدف مقایسه میزان متیلاسیون DNA ژن‌های

[1] Gestational Diabetes Mellitus

[2] Genome wide association

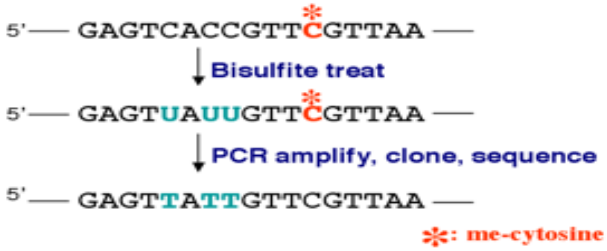
CDKN2A و CDKN2B زنان مبتلا و غیرمبتلا به دیابت بارداری انجام شد.

روش‌کار

این مطالعه مورد - شاهدی طی سال ۱۳۹۹ بر روی نمونه خون ۴۸ زن باردار در محدوده سنی ۳۵-۱۸ سال در هفته ۲۸-۲۴ بارداری (به منظور انجام آزمایش‌های دوران بارداری) شامل ۲۴ زن باردار مبتلا به دیابت بارداری (گروه مورد) و ۲۴ زن غیرمبتلا به دیابت بارداری (گروه شاهد) مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی شهید صیاد شیرازی گرگان انجام شد.
این مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق در پژوهش قرار گرفت و اطلاعات بیماران به صورت کاملاً محرمانه ثبت گردید. چک‌لیست و فرم رضایت آگاهانه شرکت در مطالعه برای بیماران تکمیل گردید. اطلاعات بیماران محرمانه بود و در اختیار هیچ شخص حقیقی و حقوقی قرار نگرفت. همچنین هیچ‌گونه هزینه اضافه بر بیماران تحمیل نگردید.
معیارهای ورود به مطالعه شامل: زنان باردار دیابتی و سالم، در محدوده سنی ۳۵-۱۸ سال، BMI نرمال، نولی‌پار و بدون سابقه دیابت خانوادگی و دیابت بارداری که در هفته ۲۴-۲۸ بارداری به‌دنبال اخذ آزمایشات غربالگری GCT و انجام تست OGTT دیابت بارداری یا عدم ابتلاء به دیابت بارداری آنان به اثبات رسیده بود. تشخیص دیابت بارداری بر این اساس بود: ۱- گلوکز ناشتای پلاسما مساوی و یا بیشتر از ۹۲ میلی‌گرم در دسی‌لیتر ۲- گلوکز ۱ ساعته (GCT) مساوی یا بیشتر از ۱۴۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر ۳- تست GTT با ۷۵ گرم گلوکز (۳ نوبت ناشتا، ۱ ساعته، ۲ ساعته) که دارای ۱ نوبت مختل از ۳ نوبت باشد.
معیارهای عدم ورود به مطالعه شامل: عدم تمایل زنان باردار به شرکت در مطالعه و زنان باردار مولتی‌پار بود.
از آزمودنی‌ها، نمونه خون در شرایط آزمایشگاهی و استریلیزاسیون اخذ و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بررسی متیلاسیون ژن‌های CDKN2A و CDKN2B با روش Bisulfite sequencing انجام شد. به‌طور خلاصه در این روش ابتدا DNA ژنومی پس از استخراج توسط سدیم بی‌سولفیت تیمار شد. سپس واکنش PCR توسط پرایمرهای خاص حالت بی‌سولفیته ژنوم انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز برده شد و پس از تأیید قطعه مورد نظر، استخراج از ژل انجام گردید. در نهایت قطعه ژنی موردنظر توالی‌یابی شد و تعداد CPGهای متیله و غیرمتیله آنالیز و با هم مقایسه گردید.
استخراج DNA ژنومی از خون توسط کیت Genomic DNA from blood شرکت سیناژن انجام شد. مراحل انجام کار به‌طور خلاصه شامل لیز کردن خون توسط بافر لیز کننده، اضافه کردن Proteinase K برای از بین بردن پروتئین‌ها، سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت یک دقیقه، شستشو و سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت یک دقیقه، شستشو و سانتریفیوژ مجدد، اضافه کردن ۳۰ مایکرولیتر Elution buffer گرما دیده و سپس سانتریفیوژ و به‌دست آوردن DNA ژنومی انجام شد. در نهایت غلظت مناسب بیشتر از ۵۰ نانوگرم برمیکرولیتر خلوص نمونه‌ها (۱/۹>A۲۶۰/A۲۸۰>۱/۷ و A۲۶۰/A۲۳۰>۱/۶) به‌وسیله خوانش توسط دستگاه نانوفتومتر تأیید شد. در این بررسی میانگین غلظت DNAهای استخراجی حدود ۱۰۰ نانوگرم برمیکرولیتر و جذب ۲۶۰/۲۸۰ در آنها حدود ۱/۸ بود.

تیمار بی‌سولفیت DNA ژنومی: بی‌سولفیت سدیم ترکیبی با فرمول شیمیایی NaHSO3 است که بیشترین کاربرد آن به‌عنوان مکمل غذایی برای گیاهان است. اثر بی‌سولفیت سدیم بر ساختار DNA به این‌صورت است که موجب تبدیل بازهای C غیرمتیله به باز U می‌شود؛ اما تغییری در ساختار 5-methylacytosine ایجاد نمی‌کند. با لحاظ شدن این تغییر، تمامی بازهای C که در ساختار ژنوم باقی می‌مانند؛ به سیتوزین‌های متیله شده مربوط می‌باشند (شکل ۱). در این‌صورت پس از انجام PCR و تعیین توالی تعداد CGها در نمونه‌های مختلف شمارش شده و با هم مقایسه می‌شوند. تیمار بی‌سولفیت DNA ژنومی به روش ستونی و با استفاده از کیت EZ DNA

Methylation-Gold™ شرکت Zymo research (USA) انجام شد که بازدهی این کیت بسیار بیشتر از کیت‌های دیگر و حدود ۹۹٪ است. به‌طور خلاصه ۵۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی استخراج شده با ۱۳۰ مایکرولیتر بافر Conversion reagent موجود در کیت ترکیب شد و با شرایط ۹۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۶۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲/۵ ساعت و نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. پس از پایان زمان انکوباسیون طبق دستورالعمل کیت شستشو، دسولفوناسیون (به‌منظور مهار سدیم بی‌سولفیت) و سانتریفیوژ انجام شد و در نهایت ۱۰ مایکرولیتر محلول نهایی حاوی DNA به‌دست آمد. DNA تیمار شده حاصل از این تکنیک به‌منظور انجام PCR و تکثیر قطعات غنی از CpG ناحیه پروموتوری ژن‌های CDKN2B و CDKN2A استفاده شد.



شکل ۱- نحوه عمل سدیم بی‌سولفیت بر روی ساختار DNA: سدیم بی‌سولفیت موجب تبدیل بازهای C غیرمتیله به باز U می‌شود، اما تغییری در ساختار 5-methylcytosine ایجاد نمی‌کند.

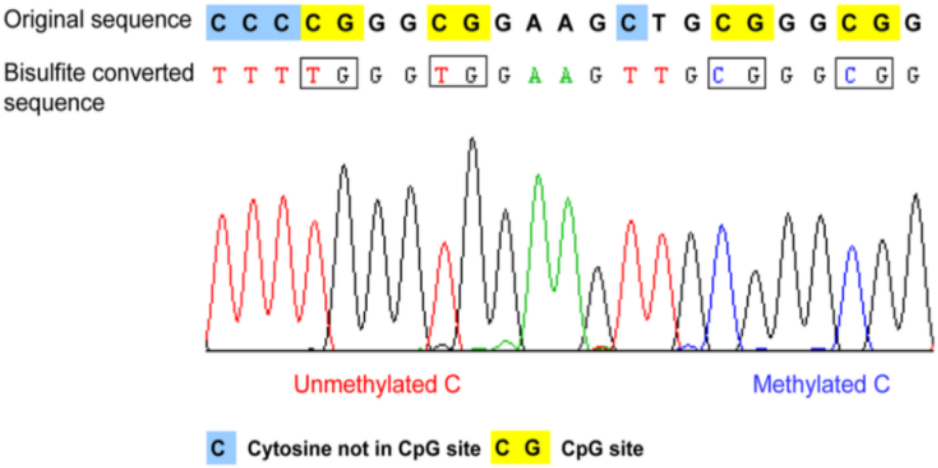
برای توالی‌یابی و آنالیز داده‌های حاصل از آن، محصولات حاصل از PCR به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. برای هر کدام از ژن‌های CDKN2B و CDKN2A دو بار خوانش انجام شد و هر بار توسط هر دو پرایمر Forward و REVERSE انجام گردید. همچنین سکانس‌های حاصل از نمونه‌های گروه دیابت بارداری و گروه غیرمبتلا به دیابت بارداری وارد نرم‌افزار آنلاین Pairwise Sequence Alignment شد و بر هم منطبق شدند. تعداد توالی CG و TG شمارش شد و میزان متیلاسیون در گروه‌های مختلف برآورد شدند. کل بازهای CG در توالی لوکوس قطعه ژنی ۱۸۶ نوکلوئتیدی ژن CDKN2A ناحیه تنظیمی ۴۸- تا ۱۳۸+ مورد شمارش قرار گرفت که برای محاسبه درصد متیلاسیون در تمام نمونه‌های مورد مطالعه دو گروه مورد و شاهد لازم بود. برای تعیین درصد متیلاسیون ژن CDKN2A گروه‌های مورد و شاهد، قطعه ژنی سیتوزین‌های متیله شمارش شد و نسبت تعداد CG-های متیله به کل تعداد بازهای CG در قطعه ژنی موردنظر به‌صورت درصد تعیین شد و میانگین متیلاسیون ژن CDKN2A در هر دو گروه مورد و شاهد محاسبه گردید. کل جزایر CpG موجود در توالی لوکوس قطعه ژنی ۲۲۱ نوکلوئتیدی ژن CDKN2B از ناحیه تنظیمی ۹۵- تا ۱۲۶+ مورد شمارش قرار گرفت که این امر برای محاسبه درصد متیلاسیون در تمام نمونه‌های گروه‌های مورد و شاهد ضروری بود. برای تعیین درصد متیلاسیون ژن CDKN2B در دو گروه شاهد و مورد، در هر یک از نمونه‌ها سیتوزین‌های میتله این جزایر شمارش شد و نسبت آن به کل جزایر CpG قطعه ژنی تنظیمی ژن CDKN2B محاسبه گردید.

حجم نمونه با توجه به مقاله آستین و همکاران (۲۰۱۹) (۹) که میانگین و انحراف معیار متیلاسیون بر سطح قندخون مادر در دو گروه شاهد و آزمون به‌ترتیب ۰/۰۰۱± ۰/۹۱ و ۰/۶۹±۰/۴۱ گزارش شده بود؛ در سطح خطای نوع اول α=۰/۰۵ و β=۰/۱، ۴۰ نفر برای دو گروه در نظر گرفته شد که با احتساب درصد ریزش نمونه و برای اطمینان از نتایج حاصل، این حجم به ۴۸ نفر افزایش یافت و در هر گروه ۲۴ واحد پژوهش به‌کار گرفته شدند.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلاف بین میانگین متیلاسیون بین گروه‌ها در دو ژن مورد مطالعه نیز با استفاده از آزمون تی دانشجویی در سطح احتمال ۵٪ مورد بررسی قرار گرفت. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excell 14 بهره گرفته شد.

یافته‌ها

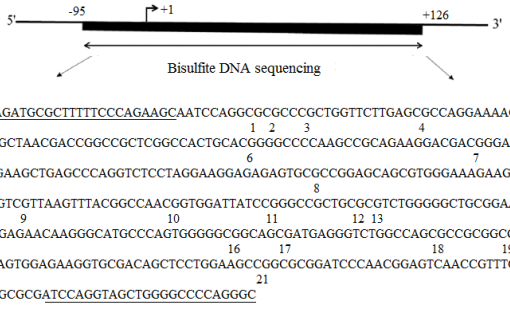
تعداد توالی CG و TG شمارش شده و برآورد میزان متیلاسیون در زنان باردار مبتلا و غیرمبتلا به دیابت بارداری در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲- تعداد توالی CG و TG شمارش شده و میزان متیلاسیون در زنان باردار مبتلا و غیرمبتلا به دیابت بارداری

نتایج توالی لوکوس قطعه ژنی ۱۸۶ نوکلئوتیدی ژن CDKN2A در شکل ۳ نشان داده شده است که در این ناحیه از ژن CDKN2A ۲۰ باز CG مشاهده گردید.

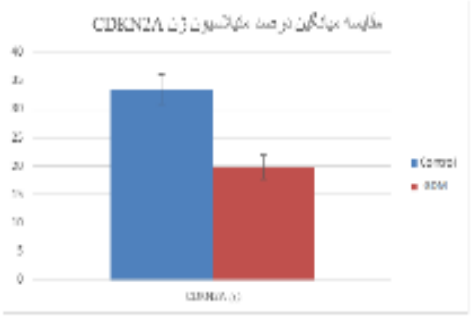
توالی لوکوس قطعه ژنی ۲۲۱ نوکلئوتیدی ژن CDKN2B در شکل ۴ آمده است؛ به‌طوری‌که در این ناحیه تنظیمی ژن موردنظر تعداد ۲۲ جزیره CpG وجود داشت.



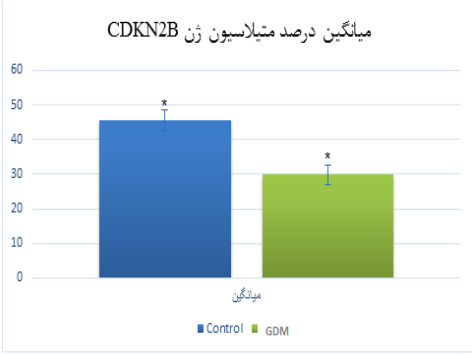
شکل۴- توالی لوکوس قطعه ۲۲۱ نوکلئوتیدی ژن CDKN2B (شمارش جزایر CpG در این قطعه از ژن و وجود ۲۲ جزیره CpG در این قطعه ژنی)

شکل ۳- توالی لوکوس قطعه ژنی ۱۸۶ نوکلئوتیدی ژن CDKN2A (شمارش جزایر CpG در این قطعه ژنی و وجود ۲۰ باز CG در این لوکوس ژنی)

نتایج مقایسه درصد متیلاسیون ژن‌های CDKN2A و CDKN2B در گروه‌های مورد و شاهد در نمودار ۱ و ۲ مشاهده می‌شود؛ به‌طوری‌که میانگین درصد متیلاسیون این دو ژن در گروه مورد پایین‌تر از گروه شاهد تعیین گردید ($p<۰/۰۵$).



نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد متیلاسیون ژن CDKN2A در دو گروه مبتلا و غیرمبتلا به دیابت بارداری (p<۰/۰۵)



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد متیلاسیون ژن CDKN2B در دو گروه مبتلا و غیرمبتلا به دیابت بارداری (p<۰/۰۵)

میانگین درصد میتلاسیون ژن CDKN2A در گروه مورد (۱۹/۷۹±۲/۰۷) کمتر از گروه شاهد (۳۳/۵۴±۲/۵۴) (p<۰/۰۵) و میانگین درصد متیلاسیون ژن CDKN2B در گروه مورد (۲۹/۹۱±۲/۸۵) کمتر از گروه شاهد (۴۵/۴۵±۲/۹۸) بود (p<۰/۰۰۱) (جدول ۱). همچنین درصد متیلاسیون ژن CDKN2B در هر دو گروه مورد و شاهد بالاتر از درصد متیلاسیون ژن CDKN2A تعیین شد.

جدول ۱- درصد متیلاسیون ژن‌های CDKN2A و CDKN2B در زنان باردار مبتلا و غیرمبتلا به دیابت بارداری مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی شهید صیاد شیرازی گرگان

ژن‌ها	گروه‌ها	تعداد	میانگین و انحراف معیار	درجه آزادی	مقدار T	سطح معنی‌داری
CDKN2A	شاهد	۲۴	۳۳/۵۴±۲/۵۴	۲۳	۱۳/۵۵	۰/۰۰۱
	مورد	۲۴	۱۹/۷۹±۲/۰۷	۲۳	۹/۸۹	
CDKN2B	شاهد	۲۴	۴۵/۴۵±۲/۹۸	۲۳	۱۵/۲۲	۰/۰۰۱
	مورد	۲۴	۲۹/۹۱±۲/۸۵	۲۳	۱۰/۴۷	

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، متیلاسیون ژن‌های CDKN2A و CDKN2B در زنان مبتلا به دیابت بارداری گروه مورد به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد. در مطالعه نمر و همکاران (۲۰۱۲) در جمعیت لبنانی، تنها CDKAL1 rs7754840 و rs7756992 با دیابت نوع ۲ ارتباط داشت، اما CDKN2A/2B rs10811661 ارتباطی با دیابت نوع دو نداشت (۱۰). در مطالعه وانگ و همکاران (۲۰۱۵) که به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم جایگاه‌های اتصال ژن CDKN2A و CDKN2B و تأثیر آن بر روی دیابت بارداری پرداختند؛ ارتباط بین SNPهای اتصال‌دهنده miR به CDKN2A/2B، حساسیت به GDM و صفات متابولیستی کمّی ارزیابی شد و شواهدی فراهم گردید که miR- binding SNPs منبع جدیدی از مکان‌های حساس به دیابت بارداری تعیین شدند. بر اساس نتایج مطالعه وانگ، ژنوتیپ CC CDKN2B rs1063192 در محل اتصال hsa-miR-323b-5p خطر ابتلاء زنان باردار چینی به دیابت بارداری را افزایش داد (۱۱).

همچنین در مطالعه دلمونیکو و همکاران (۲۰۲۰) که نرخ متیلاسیون در توالی پروموتور ATM و CDKN2A (p14ARF/p16INK4a) در خون ۵۶ زن مبتلا به سرطان پستان و ۵۵ زن غیرمبتلا به سرطان پستان با استفاده از PCR متیلاسیون بررسی شد، بیشترین درصد متیلاسیون (۴۸٪) متعلق به ژن p16INK4a در گروه زنان با ضایعات بدخیم غیرقابل تحمل پستان بود و نرخ متیلاسیون در نمونه‌های خون گروه شاهد کمتر از گروه مورد بود. آنها دریافتند که

تغییرات اپی‌ژنتیکی در ژن‌های ATM و CDKN2A با ایجاد ضایعات غیرقابل تحمل در پستان ارتباط دارند (۱۲).

علاوه بر این مطالعه ژو و همکاران (۲۰۲۰) که بر روی سلول‌های اندوتلیال عروق جفت و رویان در مادران باردار دارای دیابت بارداری انجام شد، نشان داد یک‌سری ژن‌های بیان کننده متیلاسیون در ارتباط با تغییرات متیلاسیون DNA در دیابت بارداری وجود دارند که بر این اساس ۶۷ افزایش بیان ژن و ۴۸ کاهش بیان ژن در رابطه با متیلاسیون DNA مشاهده شد (۱۳).

در مطالعه حاضر در توالی قطعه ۱۸۶ نوکلئوتیدی ژن CDKN2A، تعداد ۲۰ جزیره CpG وجود داشت. میانگین متیلاسیون این ژن در گروه شاهد و مورد به‌ترتیب برابر با ۳۳/۵۴٪ و ۱۹/۷۹٪ برآورد گردید. یافته‌های نتایج توالی‌یابی بیسولفیت برای ژن CDKN2B نیز نشان داد که در گروه شاهد تعدادی باز CG وجود داشت که متیله بودند و در قسمت مشابه توالی در نمونه مادران باردار دیابتیک این بازها به باز TG تبدیل شدند که غیرمتیله بودند. در توالی لوکوس نوکلوئتیدی ژن CDKN2B به‌طور کلی تعداد ۲۲ جزیره CpG در این قطعه شناسایی شد. میانگین درصد متیلاسیون ژن موردنظر در دو گروه شاهد و مورد به‌ترتیب برابر با ۴۵/۴۵٪ و ۲۹/۹۱٪ بود.

نتایج مطالعه لو و همکاران (۲۰۲۲) نشان داد که جفت در نواحی ژنومی که به مسیرهای مرتبط با متابولیسم گلوکز مربوط می‌شوند، دچار تغییرات متیلاسیون گسترده می‌شود. به‌طور قابل توجهی، ژن‌های تغییر یافته متیلاسیون در خون بندناف با مسیرهای مقاومت به انسولین و ترشح انسولین مرتبط بودند. DMGها و DEGها به‌طور قابل توجهی بین جفت و خون بندناف همپوشانی داشتند که نشان می‌دهد شرایط GDM می‌تواند بر جنین تأثیر بگذارد (۱۴).

متیلاسیون DNA تنظیم‌کننده اصلی تغییرات اپی‌ژنتیکی است که منجر به تغییر بیان ژن‌هایی می‌شود که در جنبه‌های متابولیسم گلوکز مانند عدم تحمل گلوکز، مقاومت به انسولین، اختلال در عملکرد سلول‌های بتا و سایر جنبه‌ها نقش دارند و در نهایت منجر به پاتوژنز دیابت نوع دو می‌گردد (۱۵). در مطالعه حاضر نیز متیلاسیون در گروه مادران باردار دیابتیک در هر دو ژن کمتر از گروه شاهد بود که به نوعی ارتباطی بین متیلاسیون این دو ژن و دیابت بارداری وجود دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده پایین‌تر بودن مقادیر متیلاسیون ژن‌های CDKN2A و CDKN2B در زنان مبتلا به دیابت بارداری در مقایسه با زنان غیرمبتلا به دیابت بارداری بود.

تشکر و قدردانی

از کارکنان مرکز آموزشی درمانی شهید صیاد شیرازی گرگان به‌خاطر همکاری در جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

در این مطالعه کلیه موارد اخلاق در پژوهش رعایت شد (IR.GOUMS.REC.1399.180).

حمایت مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم نجمه شایق برای اخذ درجه علمی کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریح می‌باشد که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان (Grant number:110526) انجام شد.

مشارکت نویسندگان

خانم نجمه شایق در جمع‌آوری نمونه‌ها، آنالیز داده‌ها و نوشتن نسخه اولیه مقاله؛ دکتر مسعود گلعلی‌پور در آنالیز داده‌ها، تفسیر داده‌ها، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تأیید نسخه نهایی مقاله و دکتر محمدجعفر گلعلی‌پور در طراحی مطالعه، تفسیر داده‌ها، نوشتن نسخه اولیه و تأیید نسخه نهایی مقاله مشارکت داشته‌اند.

منابع

1. Afkhami-Ardekani M, Kamali-Ardekani A, Shojaoddiny-Ardekani A. Effects of garlic on serum lipids and blood glucose of type 2 diabetic patients. Int J Diab Dev Ctries 2006; 26(2):86-8.
2. Hajifaraji M, Dolatkhah N. Probiotics and metabolic outcomes of gestational diabetes: A review article. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2018; 28(162):155-74.
3. Zangeneh M, Mohamadi N, Kolahi T, Roshanei G, Khodaveisi M, Shayan A. Prevalence of gestational diabetes mellitus in perganant women rreferred totheraputic and health centers in Hammadan town, Iran in the 2015. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism 2018; 17(3):139-46.
4. Talebzadeh N, Ghorbian S. Evaluation of Promoter Methylation Pattern of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Gene in Metabolic Syndrome Patients of East Azerbaijan Province. Journal of Arak University of Medical Sciences 2018; 21(4):30-9.
5. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology 2008; 135(4):1079-99.
6. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 2001; 293(5532):1089-93.
7. Kordi M, Banaei M, Asgharipour N, Mazloum SR, Akhlaghi F. Prediction of self-care behaviors of women with gestational diabetes based on Belief of Person in own ability (self-efficacy). The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility 2016; 19(13):6-17.
8. Mohamadzadeh Larijan H, Nikravan A, Aeenparast A. The role of hospital intervention in prevention of diabetes in pre-diabetes patients. Payesh (Health Monitor) 2019; 18(5):465-73.
9. Steyn A, Crowther NJ, Norris SA, Rabionet R, Estivill X, Ramsay M. Epigenetic modification of the pentose phosphate pathway and the IGF-axis in women with gestational diabetes mellitus. Epigenomics 2019; 11(12):1371-85.
10. Nemr R, Almawi AW, Echtay A, Sater MS, Daher HS, Almawi WY. Replication study of common variants in CDKAL1 and CDKN2A/2B genes associated with type 2 diabetes in Lebanese Arab population. Diabetes research and clinical practice 2012; 95(2):e37-40.
11. Wang X, Li W, Ma L, Gao J, Liu J, Ping F, et al. Association study of the miRNA-binding site polymorphisms of CDKN2A/B genes with gestational diabetes mellitus susceptibility. Acta diabetologica 2015; 52:951-8.
12. Delmonico L, Silva Magalhaes Costa MA, Gomes RJ, De Oliveira Vieira P, Da Silva AB, Fournier MV, et al. Methylation profiling in promoter sequences of ATM and CDKN2A (p14ARF/p16INK4a) genes in blood and cfDNA from women with impalpable breast lesions. Oncology Letters 2020; 19(4):3003-10.
13. Zhu W, Shen Y, Liu J, Fei X, Zhang Z, Li M, et al. Epigenetic alternations of microRNAs and DNA methylation contribute to gestational diabetes mellitus. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2020; 24(23):13899-912.
14. Lu S, Wang J, Kakongoma N, Hua W, Xu J, Wang Y, et al. DNA methylation and expression profiles of placenta and umbilical cord blood reveal the characteristics of gestational diabetes mellitus patients and offspring. Clinical Epigenetics 2022; 14(1):69.
15. Alam F, Islam A, Hua Gan S, Mohamed M, Haryo Sasongko T. DNA methylation: an epigenetic insight into type 2 diabetes mellitus. Current pharmaceutical design 2016; 22(28):4398-419.

DNA methylation of CDKN2A and CDKN2B genes in pregnant women infected and non-infected with gestational diabetes

Najmeh Shayegh[1], Masood Golalipour[2], Mohammad Jafar Golaipour[3*]

1. M.Sc. in Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Genetics, Medical Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
3. Professor, Department of Anatomical Sciences, Gorgan Congenital Malformations Research Center, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Received: Apr 22, 2024 **Accepted:** Jul 31, 2024

Abstract

Introduction: Diabetes is one of the metabolic diseases characterized by hyperglycemia and disruption of glucose homeostasis. Gene methylation is one of the epigenetic mechanisms that results in the silencing of the desired gene. CDKN2A and CDKN2B genes are associated with gestational diabetes. The present study was conducted with aim to compare the DNA methylation level of CDKN2A and CDKN2B genes in women infected and non-infected with gestational diabetes.

Methods: This case-control study was carried out during 2020 on 48 pregnant women in age range of 18-35 years in 24-28 weeks of gestation including 24 pregnant women with gestational diabetes (case group) and 24 pregnant women without gestational diabetes (control group) that had referred to Shahid Sayad Shirazi Medical Education Center, Gorgan. After DNA extraction from blood, the methylation of the genes was investigated by bisulfite sequencing, and then the desired gene fragment was sequenced, and the number of methylated and unmethylated CPGs was analyzed. The data were analyzed by SPSS software (version 16) and student t-test. $P<0.05$ was considered significant.

Results: The mean percentage of CDKN2A gene methylation in the case group (19.79±2.07) was lower than the control group (33.54±2.54) ($P<0.05$). Also, the mean percentage of CDKN2B gene methylation in the case group (29.91±2.85) was lower than the control group (45.45±2.98) ($P<0.05$).

Conclusion: The findings of the present study indicated lower values of the mutilation of CDKN2A and CDKN2B genes in pregnant woman with gestational diabetes compared to the pregnant women without gestational diabetes.

Keywords: DNA Methylation, Epigenome, Gestational Diabetes

► **Please cite this article as:**
Shayegh N, Golalipour M, Golaipour MJ. DNA methylation of CDKN2A and CDKN2B genes in pregnant women infected and non-infected with gestational diabetes. **Iran J Obstet Gynecol Infertil** 2024; 27(5):32-40. **DOI:** 10.22038/ijogi.2024.78010.5995