

بررسی پلی مورفیسم XmnI در ناحیه 5' ژن آپولیپروتئین AI در بیماران هیپرلیپیدمیک

احمد رضا بندگی^{۱*} (Ph.D)، محسن فیروز رأی^۱ (Ph.D)، عبدالوهاب احسانی زنوز^۱ (Ph.D)، محمدرضا اکبری عیدگاهی^۳ (Ph.D)، علی اکبر شعبانی^۳ (Ph.D)، مجتبی ملک^۴ (M.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی

۲- دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

۳- دانشگاه علوم پزشکی سمنان، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

۴- دانشگاه علوم پزشکی سمنان، بیمارستان فاطمیه (ع)، گروه داخلی

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات متعددی، ارتباط پلی مورفیسم‌های موجود در مجموعه ژنی ApoAI- CIII-AIV را با هیپرلیپیدمی نشان داده‌اند. این مطالعه، جهت نشان دادن ارتباط میان پلی مورفیسم XmnI در ناحیه 5' ژن آپولیپروتئین AI (2500 T - C) در بیماران ایرانی مبتلا به هیپرلیپیدمی اولیه انجام شد.

مواد و روش‌ها: DNA ژنومیک ۷۶ نفر بیمار با هیپرلیپیدمی اولیه و ۷۵ نفر فرد سالم با میزان لیپیدهای طبیعی خون تهیه گردید، که گروه کنترل از نظر سن و جنس با گروه هیپرلیپیدمیک مشابه‌سازی شدند. تکثیر قطعه ۳۹۲ جفت بازی ناحیه 5' ژن apoAI با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و پرایمرهای ویژه انجام گردید. توزیع ژنوتیپی و فراوانی ال‌های پلی مورفیسم XmnI تعیین و میان افراد بیمار و سالم مقایسه گردید.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های X1X1، X1X2، X2X2 در گروه هیپرلیپیدمیک به ترتیب ۰/۶۳، ۰/۲۴ و ۰/۱۳ و در گروه کنترل به ترتیب ۰/۸۱، ۰/۱۱ و ۰/۰۸ بود؛ که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده شد ($p < 0.05$). فراوانی ال نادر XmnI (X2) در گروه هیپرلیپیدمیک، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت ($p < 0.01$)، ولی بین ژنوتیپ‌های مختلف XmnI در گروه هیپرلیپیدمیک، اختلاف معنی‌داری در غلظت لیپیدها و آپولیپروتئین AI مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج فوق نشان داد که پلی مورفیسم XmnI در ناحیه 5' ژن آپولیپروتئین AI در بیماران ایرانی مورد مطالعه ما همراه با هیپرلیپیدمی است. بنابراین نتایج ما تأییدی بر مطالعاتی است که ارتباط پلی مورفیسم مذکور را با هیپرلیپیدمی گزارش کرده‌اند.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم، XmnI، هیپرلیپیدمی، آپولیپروتئین AI

مقدمه

می‌باشد و یکی از فاکتورهای خطر مهم بیماری‌های قلبی -

عروقی است [۳،۹].

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده که علاوه بر فاکتورهای

هیپرلیپیدمی یک اختلال متابولیک است که ناشی از تولید

زیاد یا نقص کلیرانس لیپوپروتئین‌ها یا ترکیبی از هر دو

XmnI در بیماران مبتلا به هیپرتری‌گلیسریدمی در کره جنوبی، در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی‌داری را نشان داده است [۹].

هم‌چنین در مطالعه‌ای که بیماران هیپرلیپیدمیک از نژاد قفقازی، بر اساس سطح پلاسمایی TG طبقه‌بندی شده بودند، فراوانی ال نادر XmnI در افراد با غلظت بالای TG، افزایش معنی‌داری را نشان داد [۱۲].

به دلیل همراهی این پلی‌مورفیسم با هیپرلیپیدمی در بعضی از نژادها، مطالعه حاضر پلی‌مورفیسم XmnI در انتهای 5 ژن آپوAI را برای اولین بار در بیماران ایرانی مبتلا به هیپرلیپیدمی اولیه بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها

افراد مورد بررسی. در این مطالعه که از نوع مطالعه مقطعی - مقایسه‌ای بود، مراجعین به بیمارستان فاطمیه (س) سمنان و آزمایشگاه تشخیص پزشکی دانشکده پزشکی سمنان بین مهر تا اسفند ۱۳۸۱، توسط پرسش‌نامه و اندازه‌گیری تری‌گلیسرید (TG) و کلسترول تام (TC) مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌هایی که سطح TG یا TC آن‌ها بیش از دامنه طبیعی بود، آزمایشات تکمیلی انجام شد. افراد با بیماری تیروئید، دیابت ملیتوس، نارسایی کلیوی، بیماری کبدی، پرفشاری خون ($\geq 90 \text{ mmHg}$ دیاستولی و $\geq 160 \text{ mmHg}$ سیستولی) [۱۵]، بیماران مصرف‌کننده داروهای مؤثر بر سطح پلاسمایی لیپیدها (α - بلوکرها، دیورتیک‌ها و کنتراستپتوها) و خانم‌های حامله از مطالعه خارج شدند. در نهایت تعداد ۷۶ نفر (۳۳ مرد و ۴۳ زن) با میانگین سنی $46/1 \pm 21$ سال با هیپرلیپیدمی اولیه ($TG \geq 200 \text{ mg/dl}$ یا $LDL-c \geq 160 \text{ mg/dl}$) یا هر دو [۱۶] انتخاب گردیدند، که تمام افراد بیش‌تر از 200 mg/dl بود و تنها ۴۶ نفر آن‌ها $LDL-c \geq 160 \text{ mg/dl}$ هم داشتند. تعداد ۷۵ نفر (۳۵ مرد و ۴۰ زن) با میانگین سنی $45/3 \pm 1/4$ سال و بدون هیچ نوع سابقه بیماری خاصی و با سطح پلاسمایی $TG < 150 \text{ mg/dl}$ و $TC < 200 \text{ mg/dl}$ که از نظر سن و جنس با گروه هیپرلیپیدمیک مشابه‌سازی شدند در

محیطی مانند رژیم غذایی، کشیدن سیگار و روش زندگی، مکانیسم‌های ژنتیکی نیز در هیپرلیپیدمی نقش دارند [۱۸]. از علل ژنتیکی می‌توان، ژن‌های آپولیپوپروتئین‌ها را نام برد که تغییرات ژنتیکی در آن‌ها، همراه با دیس‌لیپیدمی است [۹].

مطالعات متعددی، همراهی تغییرات ژنتیکی مجموعه ژنی ApoAI-CIII-AIV با هیپرلیپیدمی یا آترواسکلروز را نشان داده‌اند [۶، ۹، ۲۲].

ژن‌های آپولیپوپروتئین‌های AI، CIII و AIV متصل به یکدیگر و به صورت یک مجموعه ژنی بر روی بازوی بلند کروموزوم 24q23 - 11q23 به طول ۱۷ کیلوالتون قرار دارند. محصولات این ژن‌ها، یعنی آپوپروتئین‌های AI، CIII و AIV، نقش ساختمانی و عملکردی مهمی در لیپوپروتئین‌های خون بر عهده دارند [۶].

آپو AI پروتئینی ۲۸ کیلوالتونی است که دارای ۲۴۳ اسید آمینه می‌باشد [۱۰] و محل اصلی سنتز آن در کبد و به مقدار کم‌تر در روده و قلب [۳] می‌باشد. آپوAI پروتئین اصلی HDL است و حدود ۷۵٪ قسمت پروتئینی آن را تشکیل می‌دهد [۲] و به عنوان کوفاکتور آنزیم لسیتین کلسترول اسیل ترانسفراز (Lecithin-cholesterol acyltransferase) (LCAT) عمل می‌کند؛ که این آنزیم، کلسترول آزاد پلاسمای را به کلسترول استریفیه تبدیل می‌نماید [۲].

آپوAI، نقش مهمی در تعیین غلظت پلاسمایی HDL و محافظت در برابر پیشرفت آترواسکلروز و نیز نقش کلیدی در مسیر انتقال معکوس کلسترول دارد. هم‌چنین گروهی از محققین بر این عقیده‌اند که آپوAI از طریق اعمال آنتی‌اکسیدان، آنتی‌ترومبیک و ضدالتهابی، دیواره عروق را در برابر آترواسکلروز محافظت می‌کند [۳].

در مطالعات مختلف، افزایش سطح پلاسمایی LDL و کاهش HDL یا آپوAI به عنوان فاکتور خطر بیماری‌های قلبی - عروقی مطرح شده‌اند [۲]. هم‌چنین تعدادی از بررسی‌ها، تغییرات ژنتیکی در ژن آپوAI را در افزایش تری‌گلیسرید دخیل می‌دانند [۶]. این مطالعات در نژادها و اقوام مختلف انجام شده است؛ برای مثال فراوانی ال نادر

(Tris-EDTA) TE با $\text{pH} = 7.4$ حل و در دمای 4°C نگهداری شد. با استفاده از دستگاه Gene Quant II و تعیین نسبت A260/A280، غلظت DNA دو رشته‌ای و پروتئین محاسبه گردید. برای اطمینان از انجام PCR، محصولات PCR در آگاروز ۱ درصد نیز الکتروفورز شد.

جهت تکثیر قطعه ۳۹۲ جفت بازی از ۲۶۷۳- تا ۲۲۸۱- نسبت به مکان شروع رونویسی ژن آپوAI (2500 T- C) که دارای مکان اثر آنزیم XmnI (ASP700) است از پرایمرهای

(Forward) 5'- GGA AAC AGG GGC CTA CAC TGT G -3'
(Reverse) 5'- GTC TGC AGC CTT TGC AGT CTG ATC -3'

[۵،۱۸] ساخت شرکت DNA Technology A/s (دائمارک) استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون PCR (Polymerase chain reaction) در دستگاه ترموسایکلر CORBETT Research (استرالیا) در دماهای مختلف و غلظت‌های متفاوت پرایمر و MgCl_2 مورد آزمایش قرار گرفت که در نهایت در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری دارای حدود ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر از بافر $10\times$ (سیناژن)، یک واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase (سیناژن)، 1mM MgCl_2 ، 1mM dNTPs، 10mM 2Mercapto ethanol و 10% Dimethyl sulfoxide (DMS)، (2ME) $0.1\text{ }\mu\text{g}$ Bovin Serum Albumin (BSA) انجام گردید.

شرایط واکنش‌های زنجیره‌ای در ترموسایکلر. ابتدا مخلوط ۳ دقیقه در دمای 94°C گرم شد تا رشته‌های DNA از هم جدا شوند و سپس ۳۳ سیکل، برنامه تغییر دمای ذیل تکرار شد: ۱ دقیقه در 94°C (Denaturation)، ۱ دقیقه در 65°C (Annealing)، ۱ دقیقه در 72°C (Extention). بعد از اتمام سیکل‌ها، به مدت ۵ دقیقه دمای 72°C و ۱ دقیقه دمای 25°C داده می‌شد.

گروه کنترل قرار گرفتند. افراد از نظر وضعیت مصرف سیگار، در دو گروه سیگاری و غیرسیگاری طبقه‌بندی شدند. افرادی که ظرف یک ماه اخیر سیگار کشیده‌اند سیگاری محسوب شدند [۷].

نمونه‌گیری. ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی بعد از حداقل ۱۲ ساعت ناشتا ماندن در لوله‌های حاوی EDTA تهیه گردید. نمونه‌های خون، بلافاصله به مدت ۳۰ دقیقه (3600g) سانتریفوژ گردید. آزمایش‌های اولیه TG، TC و قندخون ناشتا (FBS) به روش آنزیماتیک، TSH، T4 و T3 با روش رادیوایمونواسی، کراتی‌نین، اوره، آلکالین فسفاتاز، آلانین ترانس‌آمیناز و آسپاراتات ترانس‌آمیناز به روش کالری‌متریک جهت تأیید هیپرلیپیدمی اولیه بر روی پلاسما انجام گردید. باقیمانده پلاسما در 70°C - جهت آنالیز بیش‌تر لیپیدها و آپوپروتئین‌ها ذخیره گردید.

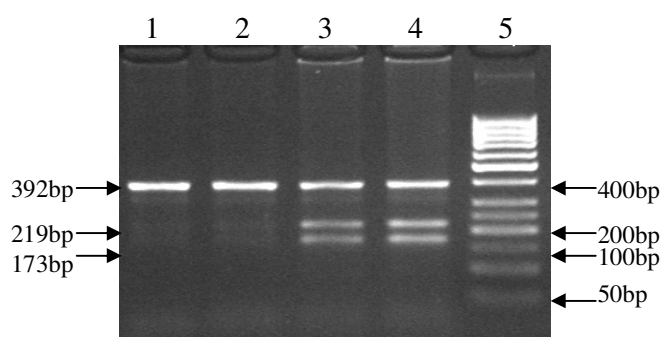
روش‌های سنجش لیپیدها و آپوپروتئین‌ها. برای اندازه‌گیری TG و TC از روش آنزیماتیک و برای LDL-C، HDL-C، آپوAI و آپوB از روش ایمونوتوربیدومتری و دستگاه اتوآنالیزور COBAS MIRA (سوئیس) استفاده شد. از سرم کنترل Diagnostic System GmbH & CO, KG (آلمان) جهت کنترل کیفی آزمایش‌ها استفاده شد. کلیه کیت‌ها از شرکت پارس آزمون تهیه گردید.

آنالیز DNA. جهت استخراج DNA ژنومیک از سلول‌های سفید خون محیطی از روش Salting out [۱۶] استفاده شد. بدین ترتیب که سلول‌های سفید تهیه شده از خون دارای EDTA، چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد (جهت لیز شدن گلبول‌های قرمز). در مرحله بعد برای لیز کردن سلول‌های سفید خون (Tris-HCl، EDTA و NaCl) TES با $\text{pH} = 7.5$ ، SDS و پروتئیناز K اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای 55°C قرار داده شد. جهت رسوب پروتئین‌ها از NaCl ۵ مولار استفاده گردید. بعد با اضافه کردن ایزوپروپانول سرد به محلول شفاف رویی، DNA رسوب داده شد. در این مرحله، کلاف DNA را برداشته و آن را در بافر

استخراج DNA به طور موفقیت آمیزی انجام گرفت و نتیجه تعیین درجه خلوص DNA (نسبت 260/A280) در تمامی موارد در حد قابل قبول (۱/۷-۱/۳) بود.

خصوصیات کلینیکی و بیوشیمیایی دو گروه هیپرلیپیدمیک و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده، دو گروه از نظر جنس و سن اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند. در گروه هیپرلیپیدمیک، غلظت پلاسمایی TG، TC، LDL-C و آپوB افزایش معنی دار ($P < 0.0001$) و غلظت پلاسمایی HDL-C و آپوAI کاهش معنی دار ($P < 0.0001$) نسبت به گروه کنترل نشان می دهند. فراوانی الل نادر بین مردان و زنان اختلاف معنی داری نشان نداد و این به ما اجازه داد که داده های مربوط به زنان و مردان را با هم ترکیب نماییم.

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است نمونه های هموزیگوت برای الل شایع (X1) دارای یک قطعه ۳۹۲ جفت بازی هستند و نمونه های هتروزیگوت که علاوه بر باند ۳۹۲ جفت بازی دارای ۲ باند اضافی ۱۷۳ و ۲۱۹ جفت بازی هم می باشند. در شکل ۲ (ستون شماره ۳) یک نمونه هموزیگوت برای الل نادر (X2) نشان داده شده است که فقط دارای ۲ باند ۱۷۳ و ۲۱۹ جفت بازی است.

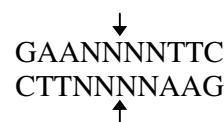


شکل ۱. ستون های ۱ و ۲ مربوط به دو نمونه هموزیگوت برای الل شایع، ستون های ۳ و ۴ مربوط به دو نمونه هتروزیگوت و ستون ۵ مربوط به سایز مارکر (50bp) است.

توزیع ژنوتیپ و فراوانی اللی پلی مورفیسم XmnI در دو گروه در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی های ۳ ژنوتیپ

محصول PCR تمام نمونه ها برای اطمینان، روی ژل آگاروز ۲ درصد در بافر TBE (0.09M Tris-borate, 0.02M EDTA, PH=8.3) و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شده و باندهای مربوطه توسط Ultraviolet transilluminator بررسی می گردید.

۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۲/۵ واحد از آنزیم محدودگر XmnI (شرکت Roche) و بافر مربوطه به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C هضم گردید. سپس بر روی آگاروز ۲ درصد و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید Run گردید. آنزیم محدودگر XmnI، توالی ذیل را تشخیص داده و در محل فلش ها زنجیر DNA را قطع می کند. الل شایع (X1) توسط آنزیم XmnI بریده نمی شود، ولی الل نادر (X2) به قطعات ۱۷۳ و ۲۱۹ جفت بازی بریده می شود.



روش های آماری. جهت محاسبات آماری از نرم افزار SPSS9/Win کمک گرفته شد. همه متغیرها از توزیع نرمال برخوردار بودند. در این مطالعه هیچ اختلاف آماری معنی داری بین مردان و زنان وجود نداشت لذا همه آنالیزها در کل گروه انجام گردید. تفاوت های آماری بین پارامترهای پلاسمای خون با استفاده از آزمون t-student محاسبه شد. فراوانی پلی مورفیسم ژن آپوAI با شمارش الل ها و ژنوتیپ ها و با استفاده از آزمون Chi-square انجام گردید. یک آنالیز واریانس (ANOVA) و به دنبال آن Tukey test برای مقایسه میانگین غلظت لیپیدها و آپولیپوپروتئین ها در میان ژنوتیپ های مختلف استفاده شد. نتایج تمام آزمایشات در متن و جدول به صورت Mean±S.E.M گزارش شده و با شرط $p < 0.05$ اختلاف معنی دار منظور گردید.

نتایج

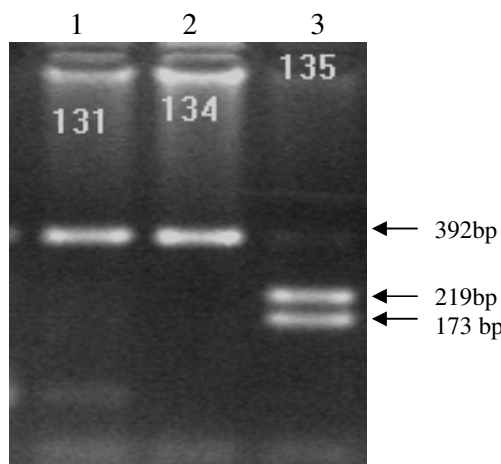
اثر ژنوتیپ‌های مختلف XmnI بر روی لیپیدها و آپوپروتئین‌های گروه هیپرلیپیدمیک در جدول ۳ نشان داده شده است که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

جدول ۱. خصوصیات بالینی و بیوشیمیایی گروه‌های مورد مطالعه

p-value	گروه هیپرلیپیدمیک n= ۷۶	گروه کنترل n=۷۵	خصوصیات
۰/۶۴	۴۶/۱±۱/۲۱	۴۵/۳±۱/۴	سن (سال)
۰/۶۹	۳۵/۴۰	۳۴/۴۳	جنس (زن/مرد)
۰/۰۰۰۱	۲۶/۹±۰/۴۳	۲۴/۷±۰/۳۸	نمای توده بدنی (Kg/m ²)
۰/۱	۶۴/۱۲	۵۵/۲۰	سیگار (سیگاری /غیرسیگاری)
۰/۰۰۰۱	۲۹۸±۶	۱۳۱±۵	کلسترول توتال
۰/۰۰۰۱	۴۳±۱۹	۱۶۰±۳	تری‌گلیسرید
۰/۰۰۰۱	۱۵۴±۵	۶۸±۳	LDL-c
۰/۰۰۰۱	۳۵/۷±۰/۸۴	۴۵/۴±۰/۸	HDL-c
۰/۰۰۰۱	۱۱۹±۱/۶	۱۳۸±۱/۵	Apo AI
۰/۰۰۰۱	۱۷۱±۴/۶	۹۶±۳/۳	Apo B

مقادیر به صورت Mean±S.E.M و واحدها برحسب میلی‌گرم بر دسی‌لیتر گزارش شده‌اند.

مختلف مشاهده شده برای XmnI (X1X2, X2X2) و X1X1 بین گروه کنترل و هیپرلیپیدمیک اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد (p<0.05). فراوانی ال‌ال X1 و X2 در گروه هیپرلیپیدمیک به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۲۶ بود که نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌دار است (p<0.01).



شکل ۲. ستون‌های ۱ و ۲ هموریگوت برای ال‌ال شایع و ستون ۳ هموریگوت برای ال‌ال نادر را نشان می‌دهد.

جدول ۲. توزیع ژنوتیپ و فراوانی ال‌الی برای پلی مورفیسم XmnI ژن ApoAI در گروه‌های مورد مطالعه

فراوانی ال‌الی (%)		ژنوتیپ					گروه کنترل (%)
X2	X1	X2X2+ X1X2	X1X1	X2X2	X1X2	X1X1	
۰/۱۳۳	۰/۸۶۶	۱۴ (۰/۱۸)	۶۱ (۰/۸۱)	۶ (۰/۰۸)	۸ (۰/۱۰۶)	۶۱ (۰/۸۱)	
۰/۲۵	۰/۷۵	۲۸ (۰/۳۷)	۴۸ (۰/۶۳)	۱۰ (۰/۱۳)	۱۸ (۰/۲۴)	۴۸ (۰/۶۳)	
۰/۰۱		۰/۰۱		۰/۰۴			p-value

جدول ۳. اثر پلی مورفیسم XmnI ژن ApoAI روی وضعیت لیپید سرم در گروه هیپرلیپیدمیک.

p-value	n= ۱۰ X2X2	n= ۱۸ X1X2	n=۴۸ X1X1	ژنوتیپ XmnI
۰/۷۶	۴۶/۴±۴	۴۷/۷±۲/۱	۴۵/۵±۱/۶	سن (سال)
۰/۵۳	۶/۴	۷/۱۱	۲۰/۲۷	جنس (زن/مرد)
۰/۲۴	۲۵/۶±۰/۸۳	۲۶/۱±۰/۷	۲۷/۴±۰/۶	نمای توده بدنی (Kg/m ²)
۰/۸۷	۹/۱	۱۵/۳	۳۹/۸	سیگار (سیگاری/غیرسیگاری)
۰/۸۵	۳۰۲±۱۸	۳۰۳±۱۳	۲۹۶±۷	کلسترول توتال
۰/۰۸	۳۲۰±۳۲	۴۲۹±۳۴	۴۵۳±۲۶	تری‌گلیسرید
۰/۳	۱۷۰±۱۴	۱۶۳±۹	۱۵۰±۶	LDL-c
۰/۱۵	۳۹/۸±۲/۱۳	۳۴/۶±۱/۱۴	۳۵/۳±۱/۱۵	HDL-c
۰/۱	۱۲۸±۴	۱۱۹±۳	۱۱۷±۲	Apo AI
۰/۶۸	۱۸۲±۱۲	۱۷۰±۱۱	۱۶۹±۵	Apo B

مقادیر به صورت Mean ± S.E.M و واحدها برحسب میلی‌گرم بر دسی‌لیتر گزارش شده‌اند.

بحث

بیش از ده پلی مورفیسم در مجموعه ژنی Apo AI-CIII-AIV مورد شناسایی قرار گرفته است که در تعدادی از مطالعات و روی جمعیت‌های خاص، ارتباط برخی از پلی مورفیسم‌ها با هیپرتری‌گلیسریدمی گزارش گردیده است [۹،۴] ولی چنین ارتباطی در برخی از بررسی‌ها مشاهده نشده است [۱۴،۱۱].

ما پلی مورفیسم XmnI در انتهای 5' ژن آپولیوپروتئین AI (C-2500 T) و اثر آن بر غلظت پلاسمایی لیپیدها و آپولیوپروتئین AI در افراد با هیپرلیپیدمی اولیه را مطالعه و با افراد سالم مقایسه کردیم. بر اساس اطلاعات ما، تا کنون هیچ‌گونه گزارشی در مورد پلی مورفیسم XmnI در ژن آپولیوپروتئین AI در جمعیت ایرانی گزارش نشده است.

نتایج این مطالعه به وضوح نشان داد که سطح لیپیدهای پلاسما به طور معنی‌داری ($P < 0.0001$) بین ۲ گروه، متفاوت می‌باشد؛ هم‌چنین در این بررسی، توزیع ژنوتیپ‌های مختلف XmnI گروه هیپرلیپیدمیک، اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت ($p < 0.05$). فراوانی الل نادر X2 در گروه هیپرلیپیدمیک بیش‌تر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$). یک رابطه آماری معنی‌دار در مورد اثر ژنوتیپ‌های مختلف XmnI بر غلظت لیپیدهای پلاسمایی در گروه هیپرلیپیدمیک به‌دست نیامد، هرچند افراد هموزیگوت در الل X2 دارای غلظت TG کم‌تری نسبت به افراد هموزیگوت در الل X1 و هتروزیگوت‌ها بودند.

چون رابطه آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف XmnI و غلظت آپوپروتئین AI در گروه هیپرلیپیدمیک به‌دست نیامد، پس می‌توان نتیجه گرفت که حضور الل نادر، باعث تغییر بیان ژن آپو AI نمی‌شود. هم‌چنین این پلی مورفیسم باعث تغییر سکانس ژن آپو AI نمی‌شود (به علت این‌که در ناحیه 2500- نسبت به مکان شروع ژن آپو AI قرار دارد)، ولی شاید حضور هم‌زمان این الل با سایر پلی مورفیسم‌ها در مجموعه ژنی Apo AI-CIII-AIV در افزایش غلظت لیپیدها و آپوپروتئین AI گروه هیپرلیپیدمیک نسبت به گروه کنترل نقش داشته باشد. به‌عبارت دیگر، افزایش غلظت لیپیدها و

آپوپروتئین AI می‌تواند نتیجه یک عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium) بین پلی مورفیسم‌های مختلف در این مجموعه ژنی باشد. لذا بهتر است این پلی مورفیسم همراه با سایر پلی مورفیسم‌های شایع در این مجموعه ژنی بررسی گردد.

در برخی از مطالعات انجام شده ارتباط پلی مورفیسم XmnI با هیپرتری‌گلیسریدمی گزارش شده است [۹]. به‌طور مثال مطالعه Hong و همکاران که بر روی افراد با هیپرتری‌گلیسریدمی اولیه صورت گرفت، فراوانی الل نادر در گروه هیپرتری‌گلیسریدمی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد؛ به‌طوری‌که فراوانی الل نادر در گروه کنترل و هیپرلیپیدمیک به ترتیب ۰/۱۷ و ۰/۲۹ بود که بیش‌تر از فراوانی مشاهده شده در مطالعه ما می‌باشد. هم‌چنین غلظت TG در میان ژنوتیپ‌های مختلف XmnI در افراد هیپرتری‌گلیسریدمیک معنی‌دار بوده است به‌طوری‌که افراد هموزیگوت در الل X2 دارای غلظت بیش‌تر TG بودند.

در مطالعه Paul-Hayase و همکاران [۱۹] که بر روی افراد با غلظت طبیعی لیپیدها در بلژیک صورت گرفته است، فراوانی الل نادر، مشابه فراوانی الل نادر در گروه کنترل این مطالعه می‌باشد.

مطالعه Ahn و همکاران [۱] که بر روی افراد سالم صورت گرفته است فراوانی الل نادر X2، ۰/۳۵ بود و یک رابطه آماری معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های مختلف XmnI و کلسترول تام، به دست آورده است به‌طوری‌که در حضور الل نادر، غلظت کلسترول تام پایین‌تر از حالت هموزیگوت X1 است. هم‌چنین در مطالعه فوق، هموزیگوت‌ها برای الل X2، دارای TG کم‌تری بودند ولی اختلاف، معنی‌دار نبود که این مشابه مطالعه ما می‌باشد.

Kessling و همکاران [۱۲] در مطالعه خود یک افزایش معنی‌دار فراوانی الل X2 در افراد غیردیابتی با تیپ IV و V هیپرلیپیدمی در طبقه‌بندی فردریکسون نشان دادند.

در مطالعه Hayden و همکاران [۸]، فراوانی الل نادر X2 در هیپرلیپیدمی مرکب فامیلی (Familial combin)

قبلی است که مجموعه ژنی Apo AI-CIII-AIV در ارتباط با هیپرلیپیدمی است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوشیمی و آزمایشگاه تشخیص پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سرکار خانم ذوالفقاری در بیمارستان فاطمیه (ع) سمنان و پرسنل محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران به خاطر همکاری صمیمانه‌شان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- [1] Ahn YI, Valdez R, Reddy AP, Cole SA, Weiss KM, Ferrell RE. DNA polymorphisms of the apolipoprotein AI/CIII/AIV gene cluster influence plasma cholesterol and triglyceride levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Hum Hered*, 1991; 41(5): 281-9.
- [2] Asztalos BF, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *Am J Cardiol*, 2003; 91:12E-17E.
- [3] Baroukh N, Lopez CE, Saleh MC, Recalde D, Vergnes L, Ostos MA, et al. Expression and secretion of human apolipoprotein A-I in the heart. *FEBS Lett*, 2004 Jan 16; 557(1-3): 39-44.
- [4] Dallinga-Thie GM, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Cantor RM, Bu X, Lusic AJ, et al. Complex genetic contribution of the Apo AI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest*, 1997 Mar 1; 99(5): 953-61.
- [5] Dallinga-Thie GM, Bu XD, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Lusic AJ, de Bruin TW. Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. *J Lipid Res*, 1996 Jan; 37(1): 136-47.
- [6] Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TW, Dallinga-Thie GM. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis*, 2001 Jul; 157(1): 1-11.
- [7] Haidari M, Moghadam M, Chinicar M, Ahmadih A, Doosti M. Apolipoprotein B as the best predictor of coronary artery disease in Iranian normolipidemic patients. *Clin Biochem*, 2001 Mar; 34(2): 149-55.
- [8] Hayden MR, Kirk H, Clark C, Frohlich J, Rabkin S, McLeod R, et al. DNA polymorphisms in and around the Apo-AI-CIII genes and genetic hyperlipidemias. *Am J Hum Genet*, 1987 May; 40(5): 421-30.
- [9] Hong SH, Park WH, Lee CC, Song JH, Kim JQ. Association between genetic variations of apo AI-CIII-AIV cluster gene and hypertriglyceridemic subjects. *Clin Chem*, 1997 Jan; 43(1): 13-7.
- [10] Ikekawa K, Matsunaga A, Han H, Watanabe H, Endo A, Tohyama J, et al. A novel two nucleotide deletion in the apolipoprotein A-I gene, apoA-I Shinbashi, associated with high density lipoprotein deficiency, corneal opacities, planar xanthomas, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2004 Jan; 172(1): 39-45.
- [11] Kee F, Amouyel P, Fumeron F, Arveiler D, Cambou JP, Evans A, et al. Lack of association between genetic variations of apo A-I-C-III-A-IV gene cluster and myocardial infarction in a sample of European male: ECTIM study. *Atherosclerosis*, 1999 Jul; 145(1): 187-95.
- [12] Kessling AM, Horsthemke B, Humphries SE. A study of DNA polymorphisms around the human apolipoprotein AI gene in

(FCHL, hyperlipidemia) بیش‌تر از گروه کنترل و افراد با هیپرلیپیدمی‌های دیگر مانند هیپرکلسترولی فامیلی و دیس‌بتالیپوپروتینمی فامیلی بود.

Tahvanainen و همکاران [۲۰]، در مطالعه خود نشان دادند که فراوانی الل نادر X2 در FCHL بیش‌تر از گروه کنترل است. مطالعه Zhang و همکاران، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل چینی و قفقازی در فراوانی اللی XmnI نشان داده است [۲۳]. در مقابل، گزارش‌هایی هم وجود دارند که هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم XmnI و هیپرلیپیدمی مشاهده نکرده‌اند، مانند مطالعه Kee و همکاران [۱۱] که بر روی بیماران MI و گروه کنترل صورت گرفته و هیچ‌گونه رابطه‌ای بین پلی مورفیسم XmnI و غلظت لیپیدها به دست نیاورده‌اند و ژنوتیپ‌های مختلف، اثر معنی‌داری بر غلظت لیپیدها در گروه کنترل نداشتند. در تعداد زیادی از مطالعات [۴، ۵، ۶، ۸] به ارتباط بین پلی مورفیسم XmnI و FCHL اشاره شده است و با توجه به این‌که در مطالعه ما تعدادی از افراد در گروه هیپرلیپیدمیک، علاوه بر افزایش TG پلاسما، کلسترول تام آن‌ها هم بیش از 95th percentile (ارزش ۹۵ درصدی) برای سن و جنس بوده است، یعنی حالتی که در FCHL مشاهده می‌شود؛ شاید افرادی با FCHL در مطالعه وارد شده‌اند و لذا ما، بین ژنوتیپ‌های مختلف XmnI در دو گروه کنترل و هیپرلیپیدمیک اختلاف معنی‌دار مشاهده کردیم.

نتایج ما نشان داد که شاید پلی مورفیسم XmnI در جمعیت ایرانی به عنوان یک مارکر ژنتیکی برای پیش‌بینی خطر افزایش TG و TC و یا آترواسکلروز مفید باشد؛ که البته برای یک نتیجه‌گیری قطعی باید این پلی مورفیسم بر روی نمونه‌های بیش‌تر و قومیت‌های مختلف کشور مطالعه شود.

نتایج به دست آمده در این مطالعه هم‌سو با مطالعاتی است که ارتباط پلی مورفیسم XmnI با هیپرلیپیدمی را گزارش کرده‌اند و نشان‌دهنده این است که هیپرلیپیدمی، علاوه بر فاکتورهای محیطی مانند شیوه زندگی، رژیم غذایی و سیگار کشیدن، تحت تأثیر ژنتیک هم می‌باشد و تأییدی بر تحقیقات

- [18] De Oliveira e Silva ER, Kong M, Han Z, Starr C, Kass EM, Juo SH, et al. Metabolic and genetic determinants of HDL metabolism and hepatic lipase activity in normolipidemic females. *J Lipid Res*, 1999; 40: 1211-21.
- [19] Paul-Hayase H, Rosseneu M, Robinson D, Van Bervliet JP, Deslypere JP, Humphries SE. Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene cluster: detection of genetic variation determining plasma apo AI, apo CIII and apo AIV concentrations. *Hum Genet*, 1992 Feb; 88(4): 439-46.
- [20] Tahvanainen E, Pajukanta P, Porkka K, Nieminen S, Ikavalko L, Nuotio I, et al. Haplotypes of the ApoA-I/C-III/A-IV gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998 Nov; 18(11): 1810-7.
- [21] Wang XL, Badenhop R, Humphrey KE, Wilcken DE. New MspI polymorphism at +83 bp of the human apolipoprotein AI gene: association with increased circulating high density lipoprotein cholesterol levels. *Genet Epidemiol*, 1996; 13(1): 1-10.
- [22] Zeng Q, Dammerman M, Takada Y, Matsunaga A, Breslow JL, Sasaki J. An apolipoprotein CIII marker associated with hypertriglyceridemia in Caucasians also confers increased risk in a west Japanese population. *Hum Genet*, 1995 Apr; 95(4): 371-5.
- [23] Zhang Q, Liu Y, Liu BW, Fan P, Cavanna J, Galton DJ. Common genetic variants of lipoprotein lipase and apolipoproteins AI-CIII that relate to coronary artery disease: a study in Chinese and European subjects. *Mol Genet Metab*, 1998 Jul; 64(3): 177-83.
- hyperlipidaemic and normal individuals. *Clin Genet*, 1985 Oct; 28(4): 296-306.
- [13] Ko YL, Ko YS, Wu SM, Teng MS, Chen FR, Hsu TS, et al. Interaction between obesity and genetic polymorphisms in the apolipoprotein CIII gene and lipoprotein lipase gene on the risk of hypertriglyceridemia in Chinese. *Hum Genet*, 1997 Sep; 100(3-4): 327-33.
- [14] Marcil M, Boucher B, Gagne E, Davignon J, Hayden M, Genest J Jr. Lack of association of the apolipoprotein A-I-C-III-A-IV gene XmnI and SstI polymorphisms and of the lipoprotein lipase gene mutations in familial combined hyperlipoproteinemia in French Canadian subjects. *J Lipid Res*, 1996 Feb; 37(2): 309-19.
- [15] Masana L, Febrer G, Cavanna J, Baroni MG, Marz W, Hoffmann MM, et al. Common genetic variants that relate to disorders of lipid transport in Spanish subjects with premature coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*, 2001 Feb; 100(2): 183-90.
- [16] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 1215.
- [17] Miltiadous G, Hatzivassiliou M, Bashiardes E, Bairaktari E, Cariolou MA, Elisaf M. Genetic polymorphisms of the apolipoprotein A-IV in a Greek population and their relation to plasma lipid and lipoprotein levels. *Clin Genet*, 2002 Sep; 62(3): 208-13.