

بررسی پلی مورفیسم ژنهای آپولیپوپروتئین‌های AI و CIII در بیماران مبتلا به گرفتگی عروق کرونر

چکیده

پلی مورفیسم‌های متعددی در مجموع ژنی آپولیپوپروتئین‌های AI، CIII، AIV مشاهده شده است. شواهد زیادی در دست است که نشان می‌دهد تغییرات ژنتیکی در ژنهای آپولیپوپروتئین‌های AI و CIII بر ابتلا به هیپرتری‌گلیسیریدمی و بیماری گرفتگی رگهای کرونر (CAD) موثر است. این مطالعه جهت نشان دادن ارتباط میان AIFLPها در ژنهای کنار هم آپولیپوپروتئین‌های AI و CIII و بیماری گرفتگی عروق کرونر در بیماران ایرانی انجام شد. مکانهای پلی مورفیک MSPI در ناحیه پروموتور ژن آپولیپوپروتئین AI (جابجایی G-۷۸A) و مکان SSTI در ناحیه غیرقابل ترجمه ۲ ژن آپولیپوپروتئین CIII (جابجایی C۳۱۷۵G) قرار دارد. ژنوم کامل DNA از خون تام ۴۶ نفر بیمار هیپرلیپیدمیک و ۳۶ نفر فرد سالم با میزان لیپیدهای طبیعی خون تهیه گردید. تکثیر قطعه ۲۸۵ جفت باز ناحیه غیرقابل ترجمه ۲ ژن آپولیپوپروتئین CIII و قطعه ۳۵۵ جفت باز ناحیه پروموتور ژن آپولیپوپروتئین AI با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) و توسط پرایمرهای ویژه انجام گردید. توزیع ژنوتیپی و فراوانی آلل‌های مربوط به پلی مورفیسم MSPI ژن آپولیپوپروتئین AI و پلی مورفیسم SSTI ژن آپولیپوپروتئین CIII تعیین و میان افراد بیمار و سالم مقایسه گردید. با وجود تفاوت معنی‌دار غلظت لیپیدهای پلاسمایی میان افراد سالم و بیمار ارتباطی میان هر یک از پلی مورفیسم‌ها با بیماری گرفتگی عروق کرونر به دست نیامد. این عدم ارتباط برای فراوانی آلل‌ها و توزیع ژنوتیپها در زنان و مردان دیده شد.

*دکتر محسن فیروززای I

دکتر عبدالوهاب احسانی II

بهنوش حسابی III

سیما خردمندکیا IV

کلیدواژه‌ها: ۱- پلی مورفیسم ۲- ژن آپولیپوپروتئین AI ۳- ژن آپولیپوپروتئین CIII
۴- هیپرتری‌گلیسیریدمی ۵- بیماری عروق کرونر قلب

مقدمه

AI، CIII، AIV و لیپوپروتئین لیپاز را در افزایش تری‌گلیسیرید و کاهش HDL دخیل می‌دانند (۱ و ۲). محصولات مجموعه خوشه‌ای ژنهای آپولیپوپروتئین‌های AI، CIII، AIV عمده‌ترین بخش پروتئینی ذرات HDL

عوامل موثر بر بروز بیماری‌های عروق کرونر شامل دیابت ملیتوس، پرفشاری خون، کشیدن سیگار، روش زندگی و دیس‌لیپیدمی می‌باشد. مطالعات مختلف تغییرات ژنتیکی در مجموعه ژنهای آپولیپوپروتئین‌های

این مقاله در ششمین کنگره بیوشیمی در تهران سال ۱۳۸۰ ارائه شده است. همچنین این مطالعه تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است (کد: ۱۹۳).

(I) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران (*مؤلف مسئول).

(II) استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.

(III) کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.

(IV) کارشناس ارشد ژنتیک، مربی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.

مرکز آموزشی درمانی قلب شهید رجایی تهران مراجعه کرده بودند.

غلظت تری گلیسیرید خون تمام بیماران بیش از ۲/۲۶ میلی مول در لیتر و گرفتگی عروق کرونر آنها توسط آنژیوگرافی تأیید شده بود.

بیماران مبتلا به دیابت قندی و هیپرلیپیدمی ثانویه در مطالعه وارد نمی شدند. ۳۶ نفر فرد سالم (۲۷ مرد و ۹ زن) نیز که غلظت لیپیدها و قند سرم خون آنها طبیعی بوده و سابقه بیماری قلبی عروقی نداشتند، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند.

از بیماران به صورت ناشتا و قبل از رفتن به اتاق عمل برای آنژیوگرافی، ۱۰ میلی لیتر خون گرفته می شد سپس ۵ میلی لیتر از این نمونه ها در ویالهای شیشه ای حاوی ماده ضد انعقاد ریخته می شد تا جهت بررسی ژنتیکی DNA استفاده گردد و ۵ میلی لیتر نیز در لوله های فاقد ماده ضد انعقاد ریخته می شد تا جهت اندازه گیری قند و لیپیدهای سرم خون مورد استفاده قرار گیرد.

اندازه گیری قند، تری گلیسیرید و کلسترول پس از گرفتن نمونه خون در آزمایشگاه مرکز قلب شهید رجایی و با استفاده از کیت های پارس آزمون و دستگاه اتو آنالیزور cobas mira انجام گردید.

اندازه گیری قند، تری گلیسیرید و کلسترول تام با روش های آنزیمی و اندازه گیری HDL-کلسترول بر اساس رسوب سرم با سولفات دکستران ویون منگنز انجام شد. مقدار کمی از سرم نیز از هر نمونه برای انجام الکتروفورز لیپوپروتئین های خون برداشت می شد.

استخراج DNA ژنومی: با استفاده از کیت استخراج DNA (Pharmacia Biotech) Rapid prep و با روش کروماتوگرافی تعویض روی ۵ میلی لیتر خون تام انجام شد نمونه خون هر فرد با بافر لیز کننده تریس HCL با PH=۵/۷ حاوی سوکروز؛ MgCl₂؛ تراپتون ۱۰۰-X و کاتون؛ روی یخ مخلوط و بهم زده می شد پس از ۵ دقیقه مخلوط کردن، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g در دمای

می باشند. ژن آپولیپوپروتئین CIII در اگزون ۴ خود محل اثر آنزیم محدودگر SSTI دارد که با جابجایی G۳۱۷۵ با C؛ محل اثر آنزیم شکل می گیرد.

در پروموتور ژن آپولیپوپروتئین AI نیز محل اثر برای آنزیم محدودگر MspI وجود دارد. محل اثر آنزیم MspI با تعویض G-۷۵ با A از بین می رود.

نشان داده شده است که این تغییر می تواند منجر به هیپرتری گلیسیریدمی و گرفتگی عروق کرونر شود.

مطالعات RFLPs در ژنهای مجموعه آپولیپوپروتئین های AIV.CIII.AI در نژادها و اقوام مختلف انجام شده است.

در سفیدپوستان اروپایی که مبتلا به هیپرتری گلیسیریدمی هستند؛ فراوانی تعویض G با C در مقایسه با افراد با میزان تری گلیسیرید طبیعی افزایش معنی داری را نشان داده بود (۳).

این تفاوت در عرب ها، ژاپنی ها، چینی ها و فنلاندی ها نیز گزارش شده است (۸-۴).

در این مطالعه با توجه به ارتباط تغییرات ژنتیکی در مجموعه خوشه ای ژنهای آپولیپوپروتئین های AIV.AIII.AI با هیپرتری گلیسیریدمی و بروز بیماری های عروق کرونر قلب، پلی مورفیسم ژنهای CIII و AI برای اولین بار در بیماران ایرانی مراجعه کننده به مرکز آموزشی و درمانی قلب شهید رجایی تهران مورد بررسی قرار گرفت. High Lipoprotein Cholesterol Density (HDL-c)، Low Lipoprotein cholesterol Density (LDL-c)، Very Low Density Lipoprotein Cholesterol (VLDL-c).

روش بررسی

در این مطالعه که از نوع مطالعه مقطعی - مقایسه ای بود، ۸۲ نفر که همگی در محدوده سنی ۶۷-۴۷ سال بودند بررسی شدند.

از این تعداد ۴۶ نفر بیمار (۳۵ مرد و ۱۱ زن) مبتلا به هیپرتری گلیسیریدمی و گرفتگی عروق کرونر بودند که به

MspI نیز افزوده گردید و سپس در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد. در ترموسایکلر ابتدا مخلوط فوق ۶ دقیقه تا دمای ۹۴°C گرم می‌شد تا رشته‌های DNA از هم جدا شوند سپس برای تکثیر؛ PCR برای ۲۲ سیکل برنامه‌ریزی می‌گردید؛ برای اطمینان از تکثیر پرموترژن apoAI محصول PCR روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد.

هضم محصولات PCR با آنزیم MspI: SstI: ۲۰ میکروگرم از DNA تکثیر شده با ۵ واحد از آنزیم MspI در بافر انکوباسیون حاوی ۱۰ تریس HCL و ۱۰ میلی‌مول کلرید منیزیم؛ ۱ میلی‌مول دی‌تیوتریتول با pH=۷/۵ به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردید.

جهت هضم محصولات PCR با آنزیم SstI از بافر انکوباسیون حاوی ۳۳ میلی‌مول تریس استات؛ ۶۶ میلی‌مول استات پتاسیم؛ ۱۰ میلی‌مول استات منیزیم؛ ۰/۵ میلی‌مول دی‌تیوتریتول با PH=۷/۹ استفاده گردید. ردیف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر پرموتر apoAI به صورت: (Sense) 3'-CACCCGGGAGACCTGCAAGC-5' (anti sense) 3'-CTGGGCAAGGCCTGAACCT-5' و پرایمرهای مورد نیاز برای تکثیر اگزون ۴ apoCIII به شکل (Sense) 3'-GGCTGGGTGACCGATGGCTTC-5' -5' GGGAGGCCAGCATGCCTGGAG 3' (anti sense) بود. پرایمرها به کمک یک دستگاه Gene assembler special/۴ (ساخت شرکت Pharmacia Biotech) در مرکز تحقیقات علوم سلولی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران سنتز گردید.

- الکتروفورز DNA و لیپوپروتئین‌های سرم: الکتروفورز DNA با استفاده از دستگاه الکتروفورز Pharmacia Biotech (مدل GNA200) به مدت ۲۵ دقیقه روی ژل آکریل انجام شد، باندها جدا شده و با رنگ‌آمیزی silver (دستگاه Hoefer UV20) ظاهر گردید.

الکتروفورز لیپوپروتئین‌های سرم روی نوار استات سلولز و در بافر نمک سدیم باربیتات با pH=۸/۴ و با استفاده از دستگاه Helena مدل Rep انجام شد و برای رنگ‌آمیزی

صفر درجه سانتیفرز می‌گردید. پس از شستشوی رسوب با همان بافر لیز کننده؛ برای خارج کردن DNA از هسته روی رسوب حاصل، بافر تریس حاوی گوانیدیوم ایزوتیوسیانات غلیظ می‌شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد انکوبه می‌گردید سپس جهت جدا کردن DNA از ناخالصی‌ها مخلوط به دست آمده به ستونهای محتوی رزین تعویض کننده آنیون اضافه می‌شد و با سر و ته نمودن ستونها محتویات بخوبی مخلوط می‌گردید. سپس ستون چند بار با بافر شستشو داده می‌شد تا ناخالصی‌ها خارج گردد.

با افزودن بافر جدا کننده به ستونها و سانتریفوژ نمودن آنها DNA متصل به رزین جدا می‌شد. با افزودن ۳ میلی‌لیتر ایزوپروپانل خالص به DNA جدا شده و انکوبه کردن به مدت ۱۰ دقیقه، مخلوط ۱/۵ ساعت با دور ۱۰۰۰g سانتریفوژ می‌شد تا DNA رسوب نماید.

سپس رسوب DNA با ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (تریس HCL ۱۰mM؛ EDTA ۱ml و pH=۷/۴) کاملاً حل می‌شد.

برای اطمینان از خالص بودن DNA استخراج شده؛ جذب آن در طول موج ۳۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه Gene Quant اندازه‌گیری و نسبت A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰} محاسبه می‌گردید.

DNA ژنومی تهیه شده روی آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شده و جهت دیدن آن از اتیدیوم بروماید و نور ماورای بنفش استفاده شد.

- تکثیر پرموترژن apo AI و اگزون ۴ در انتهای ۳ ژن apo CIII: جهت تکثیر پرموترژن apo AI که سایت برش برای آنزیم محدودگر MspI دارد یا تکثیر اگزون چهار ژن apo CIII: ۱ تا ۲ میکروگرم DNA ژنومی استخراج شده به مخلوط اولیه حاوی ۱۰۰ lu بافر ۱۰x PCR؛ ۲۰ ml ۱۰x PCR؛ ۲۰ ml dNTPs (دزکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات)؛ ۱ ul محلول اسپرمیدین و ۸۷۹ ul آب مقطر عاری از یون؛ اضافه شد سپس به مخلوط فوق ۲ واحد آنزیم Tag DNA پلیمرز ۰/۱ میلی‌گرم از هر کدام از پرایمرهای مربوط به سایت اثر

جدول شماره ۲- مقایسه فراوانی آلل‌ها در بیماران و گروه کنترل

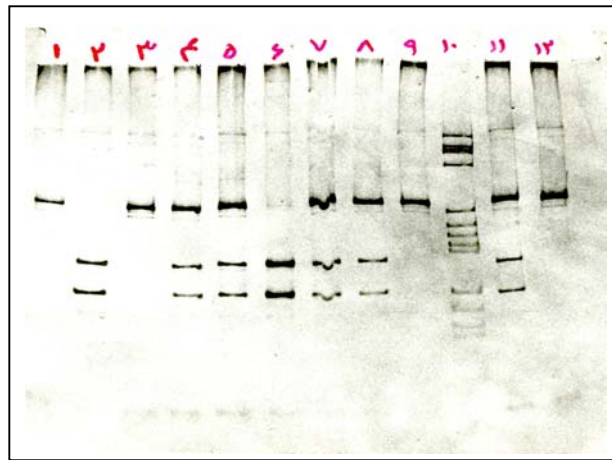
آلل‌های MstI		آلل‌های SstI					
n	M ₂	n	M ₁	n	S ₂	n	S ₁
۱۲	۰/۱۴۰	۷۴	۰/۸۶۰	۱۶	۰/۱۹۰	۶۸	۰/۸۱۰
۱۳	۰/۲۰۳	۵۱	۰/۷۹۷	۱۶	۰/۲۲۹	۵۴	۰/۷۷۱

مقایسه توزیع آلل‌های گروه بیمار با گروه سالم تفاوت آماری معنی دار نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$).

لیپوپروتئین‌های جدا شده از Fat Red7B حل شده در مخلوط متانول و سود استفاده گردید. پس از تجزیه و تحلیل آماری، نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شد. از آزمون‌های t-Student و Chi-square و آنالیز واریانس برای مقایسه نتایج استفاده گردید. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد. حدود اطمینان برای هر یک از فراوانی‌های آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

نتایج

غلظت تری گلیسیرید؛ کلسترول و VLDL- کلسترول سرم خون بیماران نسبت به افراد سالم افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.001$). مقدار HDL- کلسترول سرم خون بیماران با $P < 0.03$ در مقایسه با افراد سالم کاهش داشته است و LDL- کلسترول سرم خون بیماران بطور معنی داری بالاتر از افراد سالم بوده است ($P < 0.008$). درصد فراکشن Pre Beta در بیماران بطور معنی داری بالاتر از افراد سالم بود در حالی که درصد فراکشن Alpha و Beta در بیماران کاهش معنی داری را به ترتیب با $P < 0.001$ ، $P < 0.03$ و $P < 0.001$ را نشان داد (جدول شماره ۱).

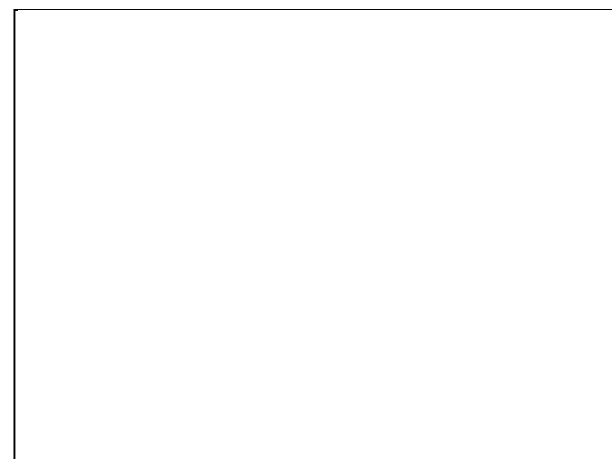


تصویر شماره ۱- الگوی الکتروفورز محصول هضم شده چند نمونه با آنزیم SstI روی ژل آکریل آمید ستون ۱۰ مربوط به مارکر و ستون ۹ مربوط به شاهد فاقد آنزیم. ستون ۱ آلل S1S1 و ستون ۲ آلل S2S2 ستون ۴ آلل S1S2 را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱- مقایسه درصد فراکشن‌های تفکیک شده

لیپوپروتئینها در گروه‌های مورد مطالعه					
	مقدار P	گروه بیمار	گروه سالم		
α - لیپوپروتئین (HDL)	۰/۰۳	۲۸/۹۱	۸/۱۱	۳۲/۵۸	۷/۴۲
Pre β - لیپوپروتئین (VLDL)	۰/۰۰۰۱	۳۳/۳۶	۷/۰۱	۲۱/۸۴	۱۰/۶۳
β - لیپوپروتئین (LDL)	۰/۰۰۱	۳۷/۳۲	۷/۰۷	۴۵/۷۱	۹/۷۴

فراوانی آلل‌های گروه بیمار در مقایسه با گروه سالم تفاوت معنی داری را نشان نداد. چنین عدم تفاوتی هم برای سایت SstI یعنی S₁(آلل معمولی) و نیز S₂(آلل نادر) مشاهده شد (جدول شماره ۲ و تصویرهای شماره ۱ و ۲).



تصویر شماره ۲- الگوی الکتروفورز محصول هضم شده چند نمونه با آنزیم MspI روی ژل آکریل آمید. ستون ۷ مربوط به مارکر، ستون ۳ آلل M1M1، ستون ۱ و ستون ۴ آلل M2M2 ستون ۵ آلل M1M2 را نشان می‌دهد.

معنی دار نبوده است. غلظت لیپیدهای سرم خون بر حسب ژنوتیپهای مختلف در کل افراد مورد مطالعه در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. مقایسه میانگین غلظت لیپیدها بین ژنوتیپهای مختلف نشان داد که تفاوت معنی داری در کل افراد مورد مطالعه با ژنوتیپهای S1S1 و S1S2 و نیز m1m1 و m2m2 وجود ندارد.

توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم سایت MspI و سایت SstI بین بیماران و افراد سالم در جدول شماره ۳ مورد مقایسه قرار گرفته است که در هیچ یک از موارد تفاوتها از نظر آماری معنی دار نبوده اند. فراوانی آللها بر حسب شدت گرفتگی عروق کرونر در بیماران با افراد سالم مقایسه گردید که در تمام زیر گروههای با گرفتگی یک، دو یا سه رگ این فراوانیها

جدول شماره ۳- توزیع ژنوتیپی بین بیماران و گروه سالم

جمع	ژنوتیپهای MspI			جمع	ژنوتیپهای SstI			
	M2M2	M2M1	M1M1		S2S2	S2S1	S1S1	
۴۳	۱	۱۰	۳۲	۴۲	۱	۱۴	۲۷	گروه بیمار
۱۰۰	۲/۳	۲۳/۳	۷۴/۴	۱۰۰	۲/۴	۳۳/۳	۶۴/۳	درصد
۳۲	۱	۱۱	۲۰	۳۵	۱	۱۴	۲۰	گروه سالم
۱۰۰	۳/۱	۳۴/۴	۶۲/۵	۱۰۰	۲/۸	۴۰	۵۷/۲	درصد

مقایسه ژنوتیپی گروه بیمار با گروه سالم تفاوت معنی داری نشان نمی دهد ($P > 0.05$).

جدول شماره ۴- مقایسه لیپیدها و لیپوپروتئینها (mmol/L) و فراکشنهای لیپوپروتئینها (درصد) در افراد مورد مطالعه بر حسب ژنوتیپهای مختلف

مختلف	m1m2	m1m1	S1S2	S1S1	
تری گلیسرید	۱/۹۸±۰/۱۸	۲/۳۰±۰/۹۱	۲/۳۰±۰/۹۴	۲/۱۵±۰/۹۸	
کلسترول	۵/۶۷±۱/۷۶	۵/۲۴±۱/۲۰	۵/۲۲±۱/۶	۵/۴۶±۰/۹۲	
HDL-c	۰/۸۷±۰/۳۰	۰/۸۵±۰/۱۸	۰/۷۹±۰/۱۶	۰/۸۶±۰/۲۴	
LDL-c	۳/۸۸±۱/۷۵	۳/۴۸±۰/۹۹	۳/۳۶±۱/۶	۳/۶۶±۰/۸۶	
VLDL-c	۰/۹۱±۰/۵۵	۱/۰۵±۰/۴۲	۱/۰۵±۰/۴۳	۰/۹۸±۰/۴۵	
α-لیپوپروتئین	۳۳/۱۵±۸/۶۰	۲۹/۶۹±۸/۰۹	۲۷/۹±۶/۴	۳۲/۶۹±۸/۷۹	
preβ	۲۳/۷۱±۹/۳۲	۳۱/۷۵±۱۱/۰۱	۲۸/۴۱±۱۱/۸۳	۳۰/۴۰±۱۰/۱۲	
β-لیپوپروتئین	۴۲/۳۲±۶/۹۰	۳۸/۰۱±۱۰/۷۱	۴۳/۰۳±۸/۲۲	۳۶/۳±۸/۸۷	

هر کدام از ژنوتیپهای S2S2 و m2m2 تنها در یک نفر از افراد مورد مطالعه مشاهده گردید. مقایسه در تمام ژنوتیپهای SS و mm معنی دار نبود.

بحث

در مجموعه ژنی apo AI-CIII-AIV حداقل ۱۱ پلی مورفیسم مورد شناسایی قرار گرفته است که در تعدادی از بررسیها ارتباط برخی از پلی مورفیسم‌های موجود در هر یک از این مجموعه با بیماری عروق کرونر (CAD) و هیپرتری‌گلیسیریدمی نشان داده شده است (۹) در حالی که چنین ارتباطی در برخی از بررسیها و روی جمعیت‌های خاص مورد تأیید قرار نگرفته است (۱۰).

در این مطالعه سایت پلی مورفیک SstI واقع در ژن apo CIII به این دلیل انتخاب شد که تغییرات آن در بسیاری از بررسیها در هیپرتری‌گلیسیریدمی مؤثر گزارش شده بود.

سایت پلی مورفیک MspI نیز به این دلیل انتخاب گردید که تغییرات این سایت در غلظت کلسترول HDL- در تعدادی از بررسیها مؤثر بیان شده بود.

از آنجا که افزایش تری‌گلیسیرید همراه با کاهش کلسترول HDL- فاکتور خطر شناخته شده برای ابتلا به بیماری عروق کرونر قلب محسوب می‌گردد، پلی مورفیسم‌های مربوط به این دو سایت در جمعیتی از بیماران مبتلا به گرفتگی رگهای قلب و جمعیتی از افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این بررسی بوضوح نشان داد که سطح لیپیدهای پلاسما بطور معنی‌داری ($P < 0.001$) بین ۲ گروه متفاوت می‌باشد اما توزیع ژنوتیپی و فراوانی آلل‌های مربوط به هر دو سایت تفاوت معنی‌داری را بین افراد سالم و بیمار نشان نداد بطور مسلم قبل از آنکه فردی دچار گرفتگی رگ یا رگهای قلب شود در اثر تغییرات ژنتیکی یا در اثر عوامل غیر ارثی مثل رژیم غذایی، مصرف سیگار و مشروبات الکلی، ورزش، روش زندگی یا حالت‌های هورمونی خاص، متابولیسم لیپیدهای خون آن فرد دچار اختلال می‌گردد.

این احتمال نیز وجود دارد که در اختلال لیپیدهای خون، عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی هر دو اثر داشته باشند.

در برخی از مطالعات انجام شده ارتباط پلی مورفیسم‌های مجموعه ژنی apo AI-CIII-AIV با هیپرتری‌گلیسیریدمی و بیماری عروق قلب بقدری محکم و قوی گزارش شده است (۵) که اثر عوامل غیر ارثی در مقابل آنها بیرنگ به نظر می‌رسد.

بطور مثال در جمعیتی از عرب‌های مبتلا به هیپرتری‌گلیسیریدمی در سایت پلی مورفیک SstI واقع در ناحیه ۳ غیرقابل ترجمه ژن آپو CIII ۷۱٪ افراد بیمار دارای آللی بوده‌اند که سایت اثر برای آنزیم SstI دارد (آلل S۱) در حالی که تنها ۳٪ افراد سالم با تری‌گلیسیرید طبیعی این آلل را در سایت مذکور داشته‌اند.

فراوانی این آلل که از جانشین شدن ساده باز C با G ایجاد می‌شود در بیماران مورد بررسی ۲۴ برابر بیشتر از افراد طبیعی بوده است.

۹۶٪ عرب‌هایی که این آلل را داشته‌اند دچار افزایش هیپرتری‌گلیسیریدمی بوده‌اند (۵).

با اینکه سایت SstI در محلی قرار ندارد که بتواند ساختمان اول آپوپروتئین CIII را تحت تأثیر قرار دهد یا بروز ژن apo CIII را تنظیم کند اما براساس این یافته‌ها پلی مورفیسم‌های این سایت به عنوان مارکر ژنتیکی معتبر بر این تشخیص و پیش‌بینی بیماری عروق کرونر کاندید می‌شوند.

در مقابل گزارش‌هایی هم وجود دارند که هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم‌های سایت SstI و هیپرتری‌گلیسیریدمی مشاهده نکرده‌اند؛ مانند بررسی Ressa و همکاران که روی جمعیت ژاپنی انجام شد و هیچ ارتباطی را بین سایت

مذکور و افزایش تری گلیسیرید خون نشان داد(۱۱).

گزارشهای نوع سومی هم وجود دارند که چند سایت پلی مورفیک را در مجموعه ژنهای apo AI-CIII-AIV مورد مطالعه قرار داده‌اند و برخی از پلی مورفیسم‌ها را در ارتباط و برخی دیگر را فاقد ارتباط با لیپیدهای خون و بیماریهای قلب گزارش کردند؛ مانند مطالعه Hong و همکاران روی جمعیت کره‌ای که در آنها پلی مورفیسم‌های SstI در رابطه با هیپرتری گلیسیریدی و پلی مورفیسم‌های MspI در ژن apo AI فاقد ارتباط با تری گلیسیرید خون نشان داده شده است(۴) و سرانجام در برخی از گزارشها با وجود آنکه حدود ۵ سایت پلی مورفیک در مجموعه ژنی apo AI-CIII-AIV مورد بررسی قرار است، هیچ یک از آنها در ارتباط با خطر ابتلا به بیماری عروق کرونر (CAD) به دست نیامد(۱۲).

نتایج به دست آمده در این مطالعه همسو با مطالعاتی است که عدم ارتباط پلی مورفیسم‌های مجموعه ژنی مذکور را با بیماری CAD گزارش کرده‌اند.

با وجود آنکه آپولیپوپروتئین‌ها نقش عمده‌ای در متابولیسم لیپیدهای خون دارند و اختلال در لیپیدهای خون در جمعیت بیمار مورد مطالعه در این پژوهش یکی از عوامل اصلی گرفتگی عروق کرونر محسوب می‌شوند؛ هیچ اختلاف معنی‌داری بین پلی مورفیسم‌های دو سایت مورد بررسی در بیماران مبتلا به گرفتگی عروق کرونر و افراد سالم وجود نداشت.

در هر دو گروه (بیمار و سالم) توزیع ژنوتیپهای سایت SstI و MspI مطابق با نسبت‌های معادله هاردی - وینبرگر بود و با روشهای آماری متعددی که در جدولهای بخش نتایج نشان داده شده است معلوم شد که نه تنها فراوانی آلل‌ها بین افراد بیمار

و سالم در کل تفاوت معنی‌داری ندارند؛ بلکه با تفکیک جنسیت نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

حتی زمانی که فراوانی آلل‌ها و توزیع ژنوتیپها بر اساس شدت گرفتگی رگها بین بیماران و همچنین زیرگروههای بیماران با افراد سالم مورد مقایسه قرار گرفت باز هم اختلاف معنی‌داری بین پلی مورفیسم‌ها به دست نیامد.

از آنجائیکه در این مطالعه تنها دو سایت پلی مورفیک از حدود ۱۱ سایت شناخته شده در مجموعه ژنی apo AI-CIII-AIV مورد بررسی قرار گرفته است نمی‌توان ادعا کرد که سایت‌های دیگر در جمعیت ایرانی با بیماریهای گرفتگی عروق کرونر در ارتباط نیستند بنابراین پیشنهاد می‌گردد بررسی سایر پلی مورفیسم‌های موجود در این مجموعه ژنی در جمعیت ایرانی انجام گردد.

نتایج به دست آمده از این بررسی و بررسیهای دیگر که نتایج مشابهی را نشان داده‌اند؛ نظریه Rose G را تقویت می‌کنند که معتقد است بیماری عروق کرونر قلب مانند بیماری پرفشاری خون یک بیماری همگانی یا توده‌ای است (mass disease) که تمام افراد جامعه با درجات متفاوتی مستعد ابتلا به آن هستند(۱۳).

اگر چه سطوح متفاوت عوامل تولید کننده آن بطور ژنتیکی به درجات مختلفی تعیین می‌گردد.

میزان بروز و تفاوت‌های موجود بین جمعیتها بطور عمده در رابطه با عوامل محیطی و روش زندگی می‌باشد.

بررسی عدم ارتباط پلی مورفیسم‌های ژنهای apo AI و apo CIII با بیماری CAD در جمعیت انتخاب شده ایرانی در این مطالعه از قدم‌های اولیه برای بررسی اثر عوامل ژنتیکی بر بیماری عروق کرونر محسوب می‌گردد.

heart disease and the apolipoprotein AI-CIII-AIV complex in japanese population, *Hum. Genet*, 1995, 95: 102-104.

7- Ko YL., KO YS., WUSM., Chen FR., Hsu TS., Chiang CW., Lee YS., Interaction between obesity and genetic polymorphism in the apolipoprotein CIII gene and lipoproteinlipase gene on the risk of hypertriglyceridemia in chinese, *Hum. Genet*, 1997, 327-333.

8- Aalto setala K., Kontula K., Sane T., Nieminem M., Nikkila E., DNA polymorphisms of apolipoprotein AI-CIII and Insulin genes in familial hypertriglyceridemia and coronary heart disease, *Atherosclerosis*, 1987, 66: 145-152.

9- Hong SH., Park WH., Lee CC., Sony JH., Kim JQ., Association between genetic variations of apo AI-CIII-AIV cluster gene and hypertriglyceridemic subjects, *clin. Chem*, 1997, 43(1): 13-17.

10- Marcil M., Boucher B., Gagne E., Davignon J., Hyden M., Jenest J., Lack of association of the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene mitation in familial combined hyperlipoproteinemia in french canadian subjects, *J. Lipid Res*, 1996, 37: 309-319.

11- Rees A., Stocks J., Paul H., Ohchi Y., Galton D., Haplotype identified by DNA polymorphisms at the apolipoprotein AI and CIII loci and hypertriglyceridemia. A study in a japanese population. *Hum. Genet*, 1986, 72: 168-171.

12- Marshall HW., Morrison LC., Wu LL., Anderson JL., Corneli PS., Stauffe DM., Allen A., Karagounis LA., Ward RH., Apolipoprotein polymorphisms fail to define risk of coronary artery disease. Results of a prospective, angiographically controlled study, *Circulation*, 1994, 89: 567-577.

13- Miller SA., Dvkes DD., Polesky HF., A simple salting out procedure for extracting

در صورتی که بررسیها در مورد سایر سایت‌های پلی مورفیک در مجموعه apo AI-CIII-AIV و سایر ژنهای مربوط به متابولیسم لیپیدها در جمعیت‌های ایرانی به نتایج مشابهی برسند در آن زمان باید عوامل ژنتیکی را در بروز بیماریهای عروق کرونر در جمعیت ایرانی کم اهمیتت و عوامل محیطی و رفتاری را بیش از پیش پراهمیت دانست.

منابع

1- Jeenah M., Kessling A., Miller N., Humphries S., G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is association with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations, *Mol. Biol. Med*, 1990, 7: 233-241.

2- Wang XL., Liu SX., McCredie RM., Wilcken DEL., Polymorphisms at the 5' end of the apolipoprotein AI gene and severity of coronary artery disease, *J. Clin*, 1996, 98: 372-377.

3- Karathanasis SK., Zannis VI., Breslow JK., Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to two different human apo CIII alleles, *J. Lipid Res*, 1985, 26: 451-456.

4- Zeng Q., Demmerman M., Takada Y., Matsunga 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, 95: 371-375.

5- Tas S., Association of a single nucleotide substitution in the 3'-untranslated region of the apolipoprotein CIII gene with common hypertriglyceridemia in Arabs, *Clin. Chem*, 1989, 35(2): 256-259.

6- Bai H., Saku K., Liu Imamura M., Arakawa K., Association between coronary

DNA from human nucleated cells, Nucleic
Acid Res, 1988, 16(3): 1215.

POLYMORPHISM OF CIII AND AI APOLIPOPROTEIN GENES IN IRANIAN PATIENT WITH CORONARY ARTERY DISEASE

^I *M. Firoozrai, Ph.D ^{II} A.V. Ehsani Zanoz, Ph.D ^{III} B. Hesabi, MSc ^{IV} S. Kheradmand Kia, MSc

ABSTRACT

Several polymorphisms within the apo AI-CIII-AIV gene cluster have been detected there is ample evidence about variations at the adjacent apo AI and apo CIII gene loci influence the risk for hypertriglyceridemia and coronary artery disease(CAD). This study was conducted to elucidate the association between two restriction fragment length polymorphisms(RFLPs) of the adjacent apo AI and CIII genes and CAD in Iranian patients. The polymorphisms sites were MspI site in the promoter region of the apo AI gene(G-78A substitution) and SstI site in the apo CIII 3' untranslated region(G 3175C substitution). Total genomic DNA was prepared from the whole blood of 46 hypertiglyceridemic patients with CAD and 36 normolipidemic Iranian subjects. Amplification of a 355 bp fragment of the promoter region of the apo AI gene and a 280 bp fragment of apo CIII 3' untranslated region were achieved by polymerase chain reaction(PCR) with specific primers. Genotype distribution and the allele frequencies for the apo AI MspI and apo CIII SstI polymorphisms were determined and compared in patients and normolipidemic healthy subjects. Despite the significant differences in plasma lipids concentration between patients and healthy subjects; no association between any of two investigated polymorphisms and coronary artery disease was found. This lack of association was held for both allele frequencies and genotype distribution in different sexes.

Key Words: 1) Polymorphism 2) Apolipoprotein AI 3) Apolipoprotein CIII 4) Hypertriglyceridemia
5) Coronary artery disease

This article is presented in 6th congeress of biochemistry, Also is conducted under financial support of under secretary of research of Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

*I) Ph.D, Associate professor of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences Hemat expressway, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran(*Corresponding author).*

II) Ph.D, Assistant professor of Biochemistry, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

III) MSc in Genetic, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

IV) MSc in Genetic, Instractor of faculty of paramedicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.