

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که از نوع مورد-شاهدی بود، ۷۶ نفر مبتلا به هیپرلیپیدمی از مراجعین به آزمایشگاه تشخیص طبی دانشگاه علوم پزشکی سمنان انتخاب شدند. ۷۵ نفر که از نظر سن و جنس با گروه بیمار همسان و فاقد علائم آزمایشگاهی بوده و به آزمایشگاه مراجعه نموده بودند، به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. پس از کسب رضایت‌نامه کتبی از مراجعین، پرسش‌نامه‌ای شامل متغیرهای سن، قد و وزن تکمیل گردید. نمایه توده بدن (BMI) از تقسیم وزن (کیلوگرم) بر مجذور قد (متر مربع) محاسبه گردید. از افراد مورد مطالعه ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی پس از ۱۲-۱۰ ساعت ناشتایی بین ساعت ۷-۹ صبح گرفته شد. که ۴ میلی‌لیتر آن در لوله حاوی EDTA (۱٪) ریخته شد و جهت استخراج DNA استفاده گردید. باقی‌مانده خون نیز جهت آزمون‌های بیوشیمیایی در لوله‌های بدون ماده‌ی ضد انعقاد ریخته شد. ابتدا لوله‌ها به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند تا سرم جدا شود. معیارهای انتخاب افراد گروه بیمار عبارت بود از: $TC > 200 \text{ mg/dL}$, $TG > 150 \text{ mg/dL}$ و افراد مبتلا به بیماری تیروئید، دیابت قندی، نارسایی کلیوی، پر فشاری خون، بیماران مصرف‌کننده داروهای موثر بر سطح پلاسمایی لیپیدها و خانم‌های حامله از مطالعه خارج شدند. همچنین افراد با سطح سرمی تری‌گلیسرید و کلسترول تام به ترتیب کم‌تر از ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در گروه کنترل قرار گرفتند. آزمایش‌های بیوشیمیایی: غلظت TC , TG , $LDL-c$ و $HDL-c$ با روش رنگ‌سنجی-آنزیماتیک و استفاده از اسپکتروفتومتر (Milton ROY, Spectronic 601) اندازه‌گیری شد و جهت تعیین آپو AI و آپو B از روش ایمونوتوربیدومتری با دستگاه اتوالیزور COBAs MIRA (سوئیس) استفاده گردید. اندازه‌گیری آپو AI و آپو B بر اساس واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن (آپو AI و یا آپو B) و تشکیل کمپلکس نامحلول آنتی‌بادی-آنتی‌ژن و سپس خوانش آن در اتوالیزور بود. تمام کیت‌های مربوط به آزمایش‌های

آپولیپروتئین‌ها نقش مهمی در تنظیم متابولیسم لیپوپروتئین دارند و آپولیپروتئین AI (آپو AI) که، پروتئین اصلی HDL می‌باشد، در فعال شدن Lecithin (LCAT) cholesterol acyl transferase و هومئوستاز کلسترول نقش مهمی بر عهده دارد [۳]. ژن آپو AI در مجموعه ژنی apoAI-CIII-AIV بر روی بازوی بلند کروموزوم 11q23-q24 قرار دارد، لذا تغییر در بیان ژن‌های این مجموعه ژنی، از جمله ژن آپو AI، یک فاکتور خطر مهم برای دیس‌لیپیدمی و آترواسکلروز می‌باشد [۵]. بعضی مطالعات ارتباط معنی‌دار پلی‌مورفیسم‌های نواحی آگزون و اینترون مجموعه ژنی apoAI-CIII-AIV با دیس‌لیپیدمی و بیماری قلبی عروقی را گزارش کرده‌اند [۶-۱۲]، در حالی که در گروهی دیگر از مطالعات، این ارتباط، معنی‌دار نبوده است [۱۳-۱۶].

یکی از محل‌های پلی‌مورفیک نزدیک به ژن آپو AI، محل اثر آنزیم اندونوکلیتاز محدودگر Pst-I است، که فاصله آن تا سیگنال پلی‌آدنیلایسون در انتهای ۳' ژن آپو AI، ۳۱۴ جفت باز است [۱۷].

به علت اهمیت آپو AI در متابولیسم لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها [۳]، ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن آپو AI از جمله PstI با غلظت لیپیدها و لیپوپروتئین‌های سرم در افراد هیپرلیپیدمی و یا بیماران قلبی عروقی جمعیت‌های مختلف بررسی شده است، که در برخی از این مطالعات [۱۷-۱۹] ارتباط معنی‌دار بوده و در گروهی دیگر ارتباط معنی‌داری مشاهده نشده است [۲۰-۲۲].

با توجه به شیوع بالای دیس‌لیپیدمی در ایران [۴]، تاکنون مطالعه‌ای جهت تعیین ارتباط فراوانی پلی‌مورفیسم PstI در ناحیه مجاور انتهای ۳' ژن آپو AI با مقادیر لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و آپو AI سرم در ایران انجام نشده است. در مطالعه حاضر، فراوانی این پلی‌مورفیسم و ارتباط آن با پروفایل لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و آپولیپروتئین‌های AI و B سرم در بیماران هیپرلیپیدمی شهر سمنان بررسی و با افراد سالم مقایسه گردید.

t-student محاسبه شد. از آزمون Chi-square برای محاسبه فراوانی ژنوتیپ‌های PstI و برای مقایسه میانگین غلظت لیپیدها و آپولیپوپروتئین‌ها در میان ژنوتیپ‌های مختلف از آنالیز واریانس (ANOVA) و Tukey test جهت تعیین ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و خطر ابتلا به هیپرلیپیدمی از آنالیز آماری رگرسیون لجستیک استفاده گردید. تعادل هاردی وینبرگ (Hardy-Weinberg) با χ^2 test تعیین شد. نتایج تمام آزمایش‌ها به صورت $S.E.M \pm Mean$ گزارش شده و با شرط $p < 0.05$ اختلاف معنی‌دار منظور گردیده است.

نتایج

خصوصیات بالینی و بیوشیمیایی دو گروه بیمار و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. دو گروه از نظر سن و جنس اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند. داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند. در گروه بیمار، مقادیر سرمی TC، TG، LDL-c، آپو AI، آپو B و آپو AI/آپو B نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار ($p < 0.0001$) و مقدار HDL-c کاهش معنی‌دار ($p < 0.0001$) نشان داد.

جدول ۱. خصوصیات دموگرافی و بیوشیمیایی گروه‌های مورد مطالعه

p-value	گروه بیمار n=۷۶	گروه کنترل n=۷۵	خصوصیات
۰/۶۴	۴۶/۱±۱۲۱	۴۵/۳±۱۱۴	سن(سال)
۰/۶۹	۳۴/۴۲	۳۵/۴۰	جنس(زن/مرد)
۰/۰۰۱	*۲۶/۹±۰/۴۳	۲۴/۷±۰/۳۸	نمای توده بدنی(kg/m ²)
۰/۱	*۲۹۸±۲۶	۱۳۱±۱۵	کلسترول توتال(mg/dL)
۰/۰۰۱	*۴۳۰±۱۹	۱۴۶±۱۳	تری گلیسرید(mg/dL)
۰/۰۰۱	*۱۰۴±۱۵	۶۸±۸	LDL-c(mg/dL)
۰/۰۰۱	*۳۵/۷±۲/۸	۴۵/۴±۳/۸	HDL-c(mg/dL)
۰/۰۰۱	*۱۱۹±۱/۶	۱۳۸±۱/۵	آپوAI(mg/dL)
۰/۰۰۱	*۱۷۱±۴/۶	۹۶±۳/۳	آپوB(mg/dL)
۰/۰۰۱	*۱/۴۴± ۰/۰۳۹	۰/۷۰± ۰/۰۲۴	آپوAI/آپوB

مقادیر به صورت Mean ± S.E.M

الگوی الکتروفورزی محصول PCR قطعه ۷۳۹ جفت بازی مربوط به ناحیه مجاور ژن آپو AI (از نوکلئوتید ۲۲۳۸ تا ۲۹۷۶) در شکل ۱ و الگوی الکتروفورزی ژنوتیپ‌های هوموزیگوت و هتروزیگوت پلی مورفیسم PstI در شکل ۲ نشان داده شده است. به طوری که آلل شایع (P1) مکان

بیوشیمیایی از شرکت پارس آزمون تهیه شد. حساسیت روش اندازه‌گیری آپو AI، ۲/۶۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و با درصد تغییرات درون آزمونی ۱/۴-۲/۶، و حساسیت روش اندازه‌گیری آپو B، ۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و با ضریب تغییرات درونی ۱/۱-۲/۵ بود.

استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ: DNA ژنومی گلوبول‌های سفید خون محیطی با روش salting out استخراج شد [۲۳]. جهت اطمینان از کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، نسبت A ۲۶۰/۲۸۰ به کمک اسپکتروفتومتر نانودراپ تعیین شد.

قطعه‌ای از DNA حاوی موقعیت پلی مورفیسم PstI به طول ۷۳۹ جفت باز در ناحیه بین ژن‌های آپو AI و آپو CIII نزدیک به انتهای ۳' ژن آپو AI با استفاده از پرایمرهای 5'-GACTGGCTTCCACTGCTGTGC-3' و 3'-GAGCGCTCTCGAGGAGTACAC-5' [۲۴] شرکت DNA Technology (دانمارک) و به کمک ترمو سایکلر CORBETT Research تکثیر گردید.

تکثیر قطعه فوق در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری دارای حدود ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰ X، یک واحد آنزیم Taq پلیمرز، dNTP (0.1mm) , MgCl2 (1mm) انجام گردید.

شرایط تکثیر DNA در ترموسایکلر: دمای ۹۴°C پنج دقیقه، سپس ۳۳ بار ۹۴°C یک دقیقه، ۶۶°C یک دقیقه، ۷۲°C یک دقیقه و نهایتاً ۷۲°C پنج دقیقه بود. برای اطمینان محصول PCR تمام نمونه‌ها، روی ژل آگاروز ۱٪ و بافر TBE با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید.

ژنوتیپ‌ها با روش RFLP [۲۴] تعیین گردید، به این ترتیب که ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۲/۵ واحد از آنزیم Pst-I شرکت (Rosch) و ۲/۵ میکرولیتر بافر مربوطه با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C هضم گردید. محصول هضم آنزیمی بر روی آگاروز ۲٪ و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید.

محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS16/win انجام و تفاوت‌های آماری بین پارامترهای سرم با استفاده از آزمون

گروه کنترل و بیمار به ترتیب ۱۴/۷ و ۲۲/۴ بود که اختلاف معنی داری نشان نداد.

جدول ۲. توزیع ژنوتیپ و فراوانی الی پلی مورفیسم PstI در گروه‌های مورد مطالعه

P-value	گروه بیمار n (%) (n=76)	گروه کنترل n (%) (n=75)	توزیع ژنوتیپ و فراوانی الی
	۴۵ (۵۹٪)	۵۴ (۷۲٪)	PIP1
۰/۲۱	۲۸ (۳۷٪)	۲۰ (۲۶/۶۶٪)	PIP2
	۳ (۴٪)	۱ (۱/۳۳٪)	P2P2
			فراوانی الی (%)
۰/۰۸۵	۷۷/۶	۸۵/۳	P1
	۲۲/۴	۱۴/۷	P2

در گروه بیمار، ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم PstI با مقادیر لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و آپولیپوپروتئین‌ها (جدول ۳) مشاهده نشد، هر چند که در افراد هوموزیگوت با ژنوتیپ P2P2، مقادیر TG و آپو AI/آپو B نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بیش تر بود، اما مقدار HDL-c این افراد از سایر ژنوتیپ‌ها کم تر بود. در گروه کنترل نیز ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم PstI با مقادیر لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و آپولیپوپروتئین‌ها مشاهده نشد (نتایج ارائه نشده است).

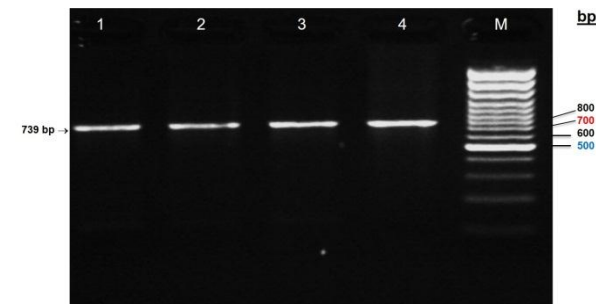
جدول ۳. مقایسه میانگین غلظت لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها بین ژنوتیپ‌های مختلف در افراد گروه بیمار

p-value	P2P2 n=۳	PIP2 n=۲۸	PIP1 n=۴۵	خصوصیات
۰/۳۳۴	۲۳±۲۵۶	۱۱±۲۹۸	۷±۳۰۱	کلسترول توتال (mg/dl)
۰/۱۷۷	۶۰±۶۰	۲۸±۴۰۹	۲۷±۴۳۱	تری گلیسرید (mg/dl)
۰/۳۳۷	۲۵±۱۱۸	۸±۱۵۶	۶±۱۵۶	LDL-c (mg/dl)
۰/۲۶۳	۶±۲۹	۳±۳۶	۱±۳۶	HDL-c (mg/dl)
۰/۳۰۴	۴±۱۰۷	۳±۱۲	۲±۱۱۹	آپو AI (mg/dl)
۰/۷۸۲	۱۷±۱۶۷	۹±۱۷۵	۵±۱۶۹	آپو B (mg/dl)
۰/۶۹۳	۰/۲±۱/۶	۰/۸±۱/۵	۰/۵±۱/۴	آپو AI/آپو B

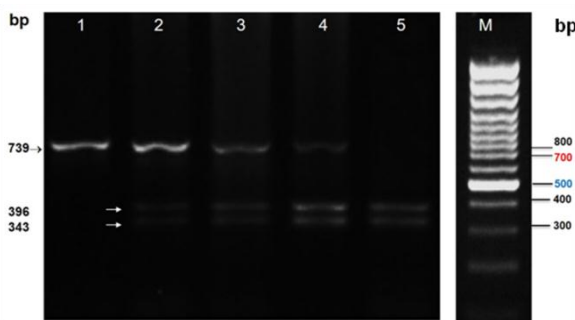
مقادیر به صورت Mean ± S.E.M

آنالیز فاکتور خطر کروموزوم دارای الی نادر (P2) برای ابتلا به هیپرلیپیدمی، ارتباط معنی داری نشان نداد. به طوری که ژنوتیپ‌های P1P2+P2P2 در مقایسه با ژنوتیپ PIP1 دارای

پلی مورفیک Pst-I فاقد جایگاه اثر آنزیم محدودگر Pst-I است ولی الی نادر (P2) دارای مکان اثر آنزیم Pst-I می‌باشد، لذا در حضور الی نادر (P2)، قطعه ۷۳۹ جفت بازی به دو قطعه ۳۹۶ و ۳۴۳ جفت بازی تبدیل می‌شود.



شکل ۱. الگوی الکتروفورز محصول PCR مربوط به پلی مورفیسم PstI (قطعه ۷۳۹ جفت بازی). ستون‌های ۱ تا ۴ مربوط به محصول PCR و ستون M سایز مارکر (100 bp) می‌باشد. (آگاروز ۱٪، بافر TBE، رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید)



شکل ۲. الگوی الکتروفورز محصول PCR مکان پلی مورفیک PstI بعد از هضم با آنزیم PstI. ستون‌های ۱ و ۵ مربوط به نمونه‌های هوموزیگوت به ترتیب با ژنوتیپ PIP1 و P2P2 و ستون‌های ۲، ۳ و ۴ مربوط به نمونه‌های هتروزیگوت با ژنوتیپ PIP2 است. ستون M سایز مارکر (100 bp) می‌باشد. (آگاروز ۰/۲٪، بافر TBE، رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید)

توزیع ژنوتیپ‌های مکان پلی مورفیک Pst-I در جمعیت مورد مطالعه، مطابق با نسبت‌های معادله هاردی - وینبرگ بود ($P > 0/۰۸$, $df=۲$, $x^2=۰/۴۱۸$).

فراوانی الی و توزیع ژنوتیپی مکان پلی مورفیک Pst-I در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی سه ژنوتیپ پلی مورفیسم Pst-I (P2 P2, P1 P2, P1P1) بین گروه کنترل و بیمار اختلاف معنی داری نداشت ($P > ۰/۲۱$, $df=۲$, $x^2=۳/۱۴۵$). هم‌چنین فراوانی الی نادر

Ordo vas و همکاران، بین پلی مورفیسم Pst-I و هیپوآلفا لیپوپروتئینی فامیلی ارتباط معنی داری مشاهده کردند، به طوری که فراوانی الل نادر PstI در ۸۸ فرد با بیماری عروق کرونر زودرس (قبل از ۶۰ سالگی) افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد. مقدار پلاسمایی HDL-C و آپو AI این بیماران کاهش معنی داری با گروه کنترل داشت، لذا نتیجه گرفتند که احتمالاً همراهی این الل نادر با یک موتاسیون دیگر در ژن آپو AI در کاهش غلظت HDL نقش داشته باشد [۱۷].

در یک مطالعه [۱۸] بر روی ۲۰۲ بیمار با بیماری عروق کرونر (بیشتر از ۵۰٪) قبل از سن ۶۰ سالگی در آمریکا، فراوانی الل نادر (P2) همراه با افزایش معنی دار غلظت تری گلیسرید در بیماران در مقایسه با گروه سالم (۱۴۵ نفر) بود.

در مطالعه paulweber [۱۹]، ۱۰۶ مرد با بیماری عروق کرونر و ۱۱۸ فرد سالم که با گروه بیمار همسان سازی شده بود ارتباط معنی داری بین این بیماری و پلی مورفیسم PstI مشاهده نشد، مطالعه آن‌ها نشان داد که مقدار HDL-C در افراد با ژنوتیپ PIP2 به طور معنی داری کم تر از افراد با ژنوتیپ PIP1 می باشد. در مطالعه حاضر نیز افراد با ژنوتیپ P2P2 دارای HDL-C کم تری نسبت به ژنوتیپ‌های PIP1 و PIP2 بودند هر چند این اختلاف معنی دار نبود.

بررسی پلی مورفیسم PstI در ۱۳۲ فرد سالم در کره جنوبی توسط Song و همکاران [۲۲]، هیچ اختلاف معنی داری در فراوانی اللی پلی مورفیسم Pst-I نشان نداد. هم چنین فراوانی الل نادر Pst-I در یک جمعیت سالم مکزیک ۰/۰۲ بود و رابطه آماری معنی داری با غلظت‌های مختلف لیپید نداشت [۲۶]. مطالعه بیماران با انفارکتوس میوکارد سوئدی نشان داد که فراوانی اللی در گروه بیمار و کنترل با یکدیگر مشابه است و فراوانی الل نادر در هر دو گروه ۰/۰۵ به دست آمد [۲۷].

مطالعه Tybjaerg و همکاران [۲۸] در دانمارک بر روی ۱۲۸ بیمار با آترواسکلروز در مقایسه با ۹۳ فرد بدون آترواسکلروز نشان داد که فراوانی الل نادر PstI در افراد مبتلا

ratio=۰/۷۷، Odd ۰/۸۹۷-۳/۵، C.I ۰/۹۵ و p-value=۰/۰۹۸ بود.

بحث و نتیجه گیری

پلی مورفیسم Pst-I در ناحیه بین ژن‌های آپو AI و CIII و مجاور انتهای ۳' ژن آپو AI است و شاید در تنظیم بیان ژن آپو AI نقش داشته باشد [۱۷]. موقعیت مکان پلی مورفیک نزدیک ژن آپو A پیشنهاد می کند که الل نادر پلی مورفیسم Pst-I در عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium) با یک موتاسیون در ژن آپو AI است که این موتاسیون یک نقص سببی در هیپو آلفالیپو پروتئینی فامیلی است. یک موتاسیون در قسمت تنظیمی ژن آپو AI می تواند منجر به کاهش سرعت رونویسی از ژن آپو AI بشود، در حالی که یک تغییر در قسمت کدکننده ژن می تواند منجر به نقص در ترجمه و ترشح آپو AI یا افزایش سرعت کاتابولیسم پروتئین مترشحه شود [۲۵].

در مطالعه حاضر، فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف بین دو گروه بیمار و کنترل اختلاف معنی داری نداشت. هم چنین اثر ژنوتیپ‌های مختلف PstI در دو گروه مورد مطالعه بر غلظت لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها، آپو AI و آپو B معنی دار نبود. در گروه بیمار، هوموزیگوت‌های با الل نادر (P2P2) در مقایسه با هتروزیگوت‌ها و هوموزیگوت‌های با الل شایع (PIP1) میانگین غلظت HDL-C و آپو AI پایین تری داشتند، ولی اختلاف معنی دار نبود.

نتایج مطالعه ما همسو با یافته‌های تعدادی از مطالعات قبلی است که در سایر جمعیت‌ها انجام شده است، مانند مطالعه Hayden و همکاران، که پلی مورفیسم Pst-I را در بیماران با هیپرلیپیدمی مختلط فامیلی، هیپرکلسترولمی و دیس بتا لیپو پروتئینی مطالعه کردند و هیچ گونه اختلاف معنی داری با گروه کنترل مشاهده نکردند [۲۰]. در مطالعه Kessler [۲۱] فراوانی الل‌ها بین دو گروه بیمار و کنترل، اختلاف معنی داری داشت، ولی ارتباط معنی داری بین فراوانی اللی و هیپرتری گلیسریدی در افراد بیمار مشاهده نشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه، پرسنل محترم آزمایشگاه تشخیص طبی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان نهایت تشکر و سپاس‌گزاری خود را به جهت همکاری برای انجام این مطالعه ابراز می‌دارند.

منابع

- [1] Cai G, Zhang B, Shi G, Weng W, Yang L, Xue S. Endothelial lipase genetic polymorphisms and the lipid-lowering response in patients with coronary artery disease on rosuvastatin. *Lipids Health Dis* 2016; 15: 148.
- [2] Hanh NT, Nhung BT, Dao DT, Tuyet LT, Hop LT, Binh TQ, Thuc VT. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipid disorders, independent of obesity-related traits in Vietnamese children. 2016 [updated Oct 10; cited 15 1]; 176]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27724906>
http://download.springer.com/static/pdf/176/art%253A10.1186%252Fs12944-016-0349-6.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fbiomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2Fs12944-016-0349-6&token2=exp=1479274848~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F176%2Fart%25253A10.1186%252Fs12944-016-0349-6.pdf*~hmac=5d19751002d3d77624ffdfa638d574d1a8d5ccc189bf4755304571c598f1a8c.
- [3] Al-Bustan SA, Al-Serri AE, Annice BG, Alnaqeeb MA, Ebrahim GA. Re-sequencing of the APOAI promoter region and the genetic association of the -75G > A polymorphism with increased cholesterol and low density lipoprotein levels among a sample of the Kuwaiti population. *Bmc Med Genet* 2013; 14: 90.
- [4] Ebrahimi H, Emamian MH, Hashemi H, Fotouhi A. Dyslipidemia and its risk factors among urban middle-aged Iranians: A population-based study. *Diabetes Metab Syndr* 2016; 10: 149-156.
- [5] Sediri Y, Kallel A, Feki M, Mourali S, Elasmı M, Abdessalem S, et al. Association of a DNA polymorphism of the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster with myocardial infarction in a Tunisian population. *Eur J Int Med* 2011; 22: 407-411.
- [6] Bandegi AR, Firoozrai M, Akbari Eidgahi MR, Kokhaei P. SstI polymorphism of the apolipoprotein CIII gene in Iranian hyperlipidemic patients: a study in Semnan province. *Iran J Basic Med Sci* 2011; 14: 506-513.
- [7] Bandegi AR, Ehsani Zenouz A, Akbari Eidgahi MR, Shabani AA, Malek M. Study of XmnI polymorphism in 5 region of the apo AI gene in Iranian hyperlipidemic subjects. *J Semnan Univ Med Sci* 2004; 6: 63-72. (Persian).
- [8] Cohen T, Karathanasis SK, Kazazian HH, Antonarakis SE. DNA polymorphic sites in the human ApoAI-CIII-AIV cluster: Taq I and Ava I. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 1924.
- [9] Daneshpour MS, Faam B, Mansournia MA, Hedayati M, Halalkhor S, Mesbah-Namin SA, et al. Haplotype analysis of Apo AI-CIII-AIV gene cluster and lipids level: Tehran lipid and glucose study. *Endocrine* 2012; 41: 103-110.

به آترواسکلروز (۰/۰۸) اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل (۰/۱) ندارد.

هر چند که در مطالعه ما، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف و دیس‌لیپیدمی مشاهده نشد، ولی می‌تواند همراهی این پلی‌مورفیسم با سایر پلی‌مورفیسم‌ها یا موتاسیون‌ها در مجموعه ژنی apoAI-CIII-AIV ارتباط معنی‌داری با غلظت لیپیدها و لیپوپروتئین‌های سرم داشته باشد. به طوری‌که یک هاپلوتیپ جدید در مطالعه Singh و همکاران [۲۹] در افراد با بیماری عروق کرونر (۱۳۹ نفر) با بیش از ۵۰٪ گرفتگی عروق کرونر در هند گزارش گردید، در مطالعه Singh، ۳ پلی‌مورفیسم PstI در ناحیه مجاور انتهای ۳' ژن آپو AI، SstI در ناحیه انتهای ۳' ژن آپو CIII و XbaI در ژن آپو AIV بررسی گردید، که هاپلوتیپ P2-X2-S1 خطر ابتلا به بیماری عروق کرونر را به میزان ۲/۳۳ برابر افزایش می‌داد. از طرفی با جایگزینی ال P2 با ال P1 خطر ابتلا به ۱/۳۳ کاهش یافت که نشان‌دهنده نقش مهم همراهی ال نادر PstI که در ناحیه غیر کدکننده ژن آپو AI می‌باشد با سایر پلی‌مورفیسم‌ها در مجموعه ژنی apoAI-CIII-AIV است. همچنین مقدار TG و نسبت LDL-C/HDL-C در افراد با این هاپلوتیپ بیش‌تر از گروه کنترل بود و مقدار HDL-C آن‌ها کم‌تر بود. به طور خلاصه، مطالعه ما نشان داد که حضور ال نادر همراه با کاهش مقدار HDL-C و آپو AI سرم است، هر چند که اختلاف معنی‌دار نبود. یکی از محدودیت‌های مطالعه ما تعداد کم نمونه‌ها بود، ضمناً چون پلی‌مورفیسم PstI در نزدیکی ژن آپو AI می‌باشد و آپو AI، آپوپروتئین اصلی HDL-C می‌باشد پیشنهاد می‌گردد، مطالعه‌ای جهت ارتباط این پلی‌مورفیسم در افراد با مقدار پلاسمایی HDL-C پایین و یا بیماران با بیماری قلبی عروقی همراه با غلظت HDL-C پلاسمایی پایین، و با حجم نمونه بیش‌تری انجام شود. از طرفی به دلیل حضور قومیت‌های مختلف در ایران، بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های مجموعه ژنی apoAI-CIII-AIV با مقادیر لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها در قومیت‌های مختلف پیشنهاد می‌گردد.

- AI-CIII-AIV gene cluster and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1988; 73: 125-133.
- [20] Hayden MR, Kirk H, Clark C, Frohlich J, Rabkin S, McLeod R, Hewitt J. DNA polymorphisms in and around the Apo-AI-CIII genes and genetic hyperlipidemias. *Am J Hum Genet* 1987; 40: 421-430.
- [21] Kessling AM, Horsthemke B, Humphries SE. A study of DNA polymorphisms around the human apolipoprotein AI gene in hyperlipidaemic and normal individuals. *Clin Genet* 1985; 28: 296-306.
- [22] Song J, Park JW, Park H, Kim JQ. Linkage disequilibrium of the Apo AI-CIII-AIV gene cluster and their relationship to plasma triglyceride, apolipoprotein AI and CIII levels in Koreans. *Mol Cells* 1998; 8: 12-18.
- [23] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- [24] Juvonen T, Savolainen MJ, Kairaluoma MI, Lajunen LH, Humphries SE, Kesaniemi YA. Polymorphisms at the apoB, apoA-I, and cholesteryl ester transfer protein gene loci in patients with gallbladder disease. *J Lipid Res* 1995; 36: 804-812.
- [25] Roma P, Gregg RE, Bishop C, Ronan R, Zech LA, Meng MV, et al. Apolipoprotein A-I metabolism in subjects with a PstI restriction fragment length polymorphism of the apoA-I gene and familial hypoalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1990; 31: 1753-1760.
- [26] 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: 281-289.
- [27] Peacock RE, Hamsten A, Johansson J, Nilsson-Ehle P, Humphries SE. Associations of genotypes at the apolipoprotein AI-CIII-AIV, apolipoprotein B and lipoprotein lipase gene loci with coronary atherosclerosis and high density lipoprotein subclasses. *Clin Genet* 1994; 46: 273-282.
- [28] Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Gerdes LU, Faergeman O, Humphries SE. Genetic markers in the apo AI-CIII-AIV gene cluster for combined hyperlipidemia, hypertriglyceridemia, and predisposition to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1993; 100: 157-169.
- [29] Singh P, Singh M, Kaur TP, Grewal SS. A novel haplotype in ApoAI-CIII-AIV gene region is detrimental to Northwest Indians with coronary heart disease. *Int J Cardiol* 2008; 130: E93-E95.
- [10] Feng DW, Ma RL, Guo H, He J, Yan YZ, Muratbek, et al. Association of APOA1 gene polymorphisms (rs670, rs5069, and rs2070665) with dyslipidemia in the Kazakhs of Xinjiang. *Genet Mol Res* 2016; 15.
- [11] Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TW, Dallinga-Thie GM. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 2001; 157: 1-11.
- [12] Liu B, Yang Q, Wang H, Zeng Y, Hu Z, Ma M, Zhang L. [Association of ApoAI gene rs12721026 polymorphism with cerebral hemorrhage in Changsha Han population and its effect on plasma lipid levels]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2013; 38: 991-996.
- [13] 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; 145: 187-195.
- [14] Ma YQ, Thomas GN, Ng MC, Critchley JA, Cockram CS, Chan JC, Tomlinson B. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI polymorphisms with high density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels and indices of obesity in selected healthy Chinese subjects and in patients with early-onset type 2 diabetes. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 442-449.
- [15] 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; 37: 309-319.
- [16] Wijsman EM, Brunzell JD, Jarvik GP, Austin MA, Motulsky AG, Deeb SS. Evidence against linkage of familial combined hyperlipidemia to the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 215-226.
- [17] Ordovas JM, Schaefer EJ, Salem D, Ward RH, Glueck CJ, Vergani C, et al. Apolipoprotein A-I gene polymorphism associated with premature coronary artery disease and familial hypoalphalipoproteinemia. *N Engl J Med* 1986; 314: 671-677.
- [18] Ordovas JM, Civeira F, Genest J Jr, Craig S, Robbins AH, Meade T, et al. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991; 87: 75-86.
- [19] Paulweber B, Friedl W, Krempler F, Humphries SE, Sandhofer F. Genetic variation in the apolipoprotein

Lack of association between PstI polymorphism in the 3' flanking region of the apolipoprotein AI gene and serum lipids levels in an Iranian population

Abbas Pakdel (Ph.D)^{1,4}, Mohammad Reza Akbari eydgahi (Ph.D)³, Ahmad Reza Bandegi(Ph.D)^{*2,4}

1 – Research Center of Nervous System Stem Cells and Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2 - Research Center of Physiology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

3 - Research Center of Biotechnology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

4- Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 22 Nov 2016; Accepted: 23 Apr 2017)

Introduction: ApoAI, is the main protein of HDL and its gene is a member of apoAI-CIII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. In some studies, association of PstI polymorphism with dyslipidemia has been reported. This study was designed to investigate the frequency of rare allele (P2) of apoAI gene PstI polymorphism and its association with serum lipids levels in an Iranian population (Semnan city).

Materials and Methods: In a case-control study genomic DNA was extracted from whole blood of 76 Iranian hyperlipidemic patients [total cholesterol (TC) > 200 mg/dL, triglyceride (TG) > 150 mg/dL] and 75 healthy control subjects (TC < 200 mg/dL and TG < 150 mg/dL) The PstI polymorphism was analyzed by PCR-RFLP.

Results: The frequencies of the PstI polymorphism minor allele (P2) were 22.14 and 14.7 in the case and control groups respectively ($P > 0.05$). In the case group, patients with P2P2 genotype had lower serum HDL-c and apoAI, compared those with P1P1 and P1P2 genotypes ($P > 0.05$).

Conclusion: Considerably, the presence of the rare P2 allele was not associated with lipid levels in the studied population. The association between the polymorphisms and dyslipidemia is quite complicated. We propose evaluation of PstI polymorphism with other polymorphic sites in the apoAI-CIII-AIV gene cluster.

Keywords: Apolipoprotein A-I, Dyslipidemias, Genetic Polymorphism

* Corresponding author. Tel: +98 23 33354170

arbandegi@yahoo.ca